

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Тверской государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России)

На правах рукописи

**АНДРИАНОВА ЕЛЕНА ВЯЧЕСЛАВОВНА**

**БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОРЕГЕНЕРАТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ  
НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО  
N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

1.5.4 – Биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.м.н., доцент Егорова Елена Николаевна

Тверь – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>19</b>
1.1. Строение и биологические эффекты N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и ее производных.....	19
1.1.1. Строение N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и ее производных	19
1.1.2. Биологические эффекты N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и ее производных .....	21
1.2. Биохимия оксидативного стресса и его биологическое значение .....	23
1.2.1. Оксиданты. Продукты перекисного окисления .....	23
1.2.2. Антиоксиданты .....	30
1.2.3. Роль оксидативного стресса в физиологических процессах и патогенезе заболеваний .....	37
1.3. Система матричных металлопротеиназ (ММР) – тканевых ингибиторов ММР (ТИМР) .....	40
1.3.1. Матричные металлопротеиназы. ММР-9 .....	40
1.3.2. Тканевые ингибиторы матричных металлопротеиназ. ТИМР-1	44
1.4. Современные представления о раневом процессе и механизмах регенерации тканей .....	45
1.4.1. Классификация ожогов по степени поражения тканей .....	45
1.4.2. Фазы раневого процесса .....	46
1.4.3. Заживление термических ожогов: локальные морфологические и биохимические изменения.....	47
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	<b>52</b>
2.1. Дизайн исследования .....	52
2.2. Эксперимент по оценке прорегенераторных свойств нового	

производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на модели термических ожогов кожи крыс .....	52
2.2.1. Объект исследования и условия содержания экспериментальных животных .....	52
2.2.2. Характеристика групп экспериментальных животных .....	54
2.2.3. Методика формирования термического ожога кожи у крыс .....	55
2.2.4. Методика приготовления мази с новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и режим обработки ожоговых ран .....	55
2.2.5. Планиметрическая оценка процесса репарации ожоговых ран у крыс .....	57
2.2.6. Получение биологического материала для биохимических исследований.....	58
2.3. Методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии для оценки резорбции нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при местных аппликациях мази с этим веществом на ожоговые раны кожи крыс	58
2.4. Биохимические исследования .....	61
2.4.1. Методика получения сыворотки крови и приготовления гомогенатов тканей из области раневых дефектов .....	61
2.4.2. Методика определения общего количества метаболитов с оксидативными свойствами .....	62
2.4.3. Методика определения общего количества метаболитов с антиоксидантными свойствами .....	63
2.4.4. Расчет показателя выраженности оксидативного стресса – индекса оксидативного стресса (ИОС) .....	65
2.4.5. Методика количественного определения матричной металлопротеиназы 9 типа (ММП-9).....	65
2.4.6. Методика количественного определения ингибитора матричных	

металлопротеиназ 1 типа (TIMP-1).....	67
2.4.7. Методика количественного определения белка .....	69
2.5. Методы статистического анализа .....	71
<b>ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА РЕПАРАЦИИ ОЖГОВЫХ РАН У КРЫС ПРИ ИХ ОБРАБОТКЕ МАЗЬЮ С НОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ .....</b>	<b>72</b>
3.1. Результаты планиметрической оценки процесса репарации ожоговых ран у крыс при их обработке мазью с новым производным N- ацетил-6-аминогексановой кислоты .....	72
3.2. Характеристика резорбции нового производного N-ацетил-6- аминогексановой кислоты при местных аппликациях мази с этим веществом на ожоговые раны кожи крыс .....	75
<b>ГЛАВА 4. ДИНАМИКА БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ГОМОГЕНАТОВ РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В ОЖГОВЫХ РАНАХ КРЫС МАЗЬЮ С НОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ .....</b>	<b>79</b>
4.1. Результаты количественного определения показателей оксидативного стресса в динамике эксперимента .....	79
4.2. Результаты количественного определения MMP-9 и TIMP-1 в динамике эксперимента .....	85
4.3. Результаты корреляционного анализа между площадью раневых дефектов и биохимическими показателями в гомогенатах регенерирующих тканей .....	91
<b>ГЛАВА 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОРЕГЕНЕРАТОР- НОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО N-АЦЕТИЛ-6- АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ (обсуждение результатов исследования) .....</b>	<b>94</b>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	106
ВЫВОДЫ .....	107
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	112

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Проблема стимулирования регенерации тканей является актуальной для биологии и медицины, поскольку число случаев травматизма в России и мире остается чрезвычайно высоким [3, 26]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) травматизм входит в десятку основных причин смертности и заболеваемости населения при этом среди всех случаев травм в мирное время ожоги занимают третье место [16, 76].

Для повышения эффективности лечения ран различного происхождения, а именно, сокращения сроков восстановления, улучшения косметического эффекта, а также снижения смертности, в клинической медицине применяют целый ряд препаратов (репаративных и регенерантов) и методик (лазерное, магнитное излучения, гемостатические и коллагеновые губки), оптимизирующих протекание типовых физиологических реакций при раневом процессе с целью ускорения регенерации тканей [91, 93, 183, 195].

Восстановление тканей и органов независимо от причины, вызвавшей их повреждение, имеет закономерную стадийность и включает стереотипный комплекс физиологических и биохимических процессов [45, 88]. Биохимической основой репарации является усиление биосинтеза в тканях пластических субстратов (аминокислот, белков, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, РНК и ДНК, фосфолипидов и т.д.) и ускорение процессов энергообеспечения благодаря активации специфических и общих путей метаболизма. Типовые физиологические процессы (экссудация, воспаление, пролиферация, ремоделирование и т.п.) также связаны с адаптивными изменениями протекания биохимических реакций (изменение кислотно-основного состояния, усиление свободнорадикальных реакций, активация синтеза эйкозаноидов, нарушение баланса протеолиз-синтез белков и т.д.) [55, 84].

Среди многочисленных веществ, обладающих прорегенераторной активностью, известна N-ацетил-6-аминогексановая (ацексамова) кислота (АК),

для которой установлена способность ускорять заживление ран кожи и слизистых оболочек, переломов трубчатых костей [9, 17, 65]. Для совершенствования протективных свойств АК были синтезированы ее производные – ацексаматы цинка, натрия, магния, кальция, серебра, этилтиазолиламид, показавшие лучший прорегенераторный эффект [27, 57, 60, 62, 202]. Важно отметить, что для АК и указанных ее производных не установлены биохимические процессы, ассоциированные с их прорегенераторным действием.

Новое производное АК – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N- ацетил-6-аминогексаноат (ацексамат) – синтезировано в АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна) профессором С.Я. Скачиловой. Потенциальная прорегенераторная активность данного производного АК может быть связана, как с наличием в его составе АК с доказанными стимулирующими регенерацию тканей свойствами, так и остатка пиридиния. Известно, что производными пиридиния в организме человека являются, в частности, никотиновая кислота, никотинамид, никотинамидадениндинуклеотид (НАД), являющийся коферментом НАД-зависимых дегидрогеназ. Пиридиновое кольцо входит в состав молекулы витамина В<sub>6</sub>, который в форме фосфорного эфира – пиридоксальфосфата, представляет собой кофермент трансаминаз, ферментов, катализирующих реакции трансаминирования, в результате которых происходит синтез заменимых аминокислот [13].

Учитывая изложенное выше, представляется актуальным изучение влияния нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата – на регенерацию ожоговых ран кожи крыс при его местном применении, а также адаптивных биохимических процессов, сопровождающих репарацию раневых дефектов.

### **Степень разработанности темы исследования**

У N-ацетил-6-аминогексановой (ацексамовой) кислоты в экспериментальных и клинических исследованиях была обнаружена слабо выраженная способность оптимизировать заживление ран кожи, слизистых

оболочек и переломов трубчатых костей [9, 17, 65]. С целью усиления ее прорегенераторных свойств в Российской Федерации и зарубежом были синтезированы производные ацексамовой кислоты – ацексаматы цинка, натрия, магния, кальция, серебра, этилтиазолиламида, которые продемонстрировали более эффективное действие на процессы репарации различных тканей [27, 60]. Однако, как для ацексамовой кислоты, так и ее производных не были расшифрованы биохимические механизмы, ассоциированные с их прорегенераторными свойствами.

### **Цель исследования**

Изучить биохимические аспекты прорегенераторного действия нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ) – при его применении в виде мази при заживлении термических ожогов кожи крыс.

### **Задачи исследования**

1. Выполнить эксперимент по моделированию термических ожогов кожи у крыс и их ежедневной обработке мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ до полного заживления ран.
2. Провести планиметрическое исследование динамики заживления раневых дефектов кожи крыс при местном воздействии мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6- АГ в ходе эксперимента.
3. Оценить эффективность использования курса аппликаций мази с 2- Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ при местном лечении термических ожогов кожи крыс.
4. Изучить выраженность оксидативного стресса в тканях раневых дефектов и сыворотке крови крыс при обработке экспериментальных термических ожогов кожи мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ на этапах регенерации ран.
5. Изучить динамику уровней матриксной металлопротеиназы 9 типа (ММР-9) и ингибитора матриксных металлопротеиназ 1 типа (ТИМР-1) в тканях раневых дефектов и сыворотке крови при аппликациях на экспериментальные



термические ожоги кожи крыс мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в процессе регенерации ран.

6. Разработать методику количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии и определить его резорбцию из мази при аппликации на ожоговые раны животных.

7. Выявить наличие корреляционных связей между площадями раневых дефектов и изученными биохимическими показателями на различных фазах раневого процесса.

### **Легитимность исследования**

На проведение настоящего исследования получено положительное решение Этического комитета ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России протокол № 3 от 30 сентября 2020 года. Экспериментальная работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых для научных целей» (Directive 2010/63/EU).

### **Научная новизна исследования**

Впервые выявлена прорегенераторная активность нового производного АК – 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, которая проявилась в сокращении сроков заживления термических ожогов кожи крыс в эксперименте при их ежедневной обработке мазью с данным веществом по сравнению с животными контрольных групп.

Впервые охарактеризована динамика выраженности оксидативного стресса в тканях раневых дефектов и сыворотке крови крыс при обработке экспериментальных термических ожогов кожи мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6- АГ на этапах восстановительного процесса в коже.

Впервые изучена динамика уровней ММР-9 и ТИМР-1 в тканях раневых дефектов и сыворотке крови при обработке экспериментальных термических ожогов кожи крыс мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ на этапах регенерации ран.

Разработана методика количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N- А-6- АГ в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии с целью

определения его резорбции из мази при аппликации на ожоговые раны животных.

Получены новые данные о взаимосвязи между площадями раневых дефектов и изученными биохимическими показателями в различные фазы раневого процесса.

Новизна полученных результатов подтверждается полученными свидетельствами на ноу-хау, базу данных и патентом на изобретение.

### **Теоретическая и практическая значимость результатов исследования**

Установлена динамика биохимических процессов, ассоциированных с ускорением заживления экспериментальных термических ожогов кожи животных при их местном лечении мазью с новым производным АК – 2-Э-6-М- 3-ГП N-A-6-АГ.

Разработана методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс.

Результаты проведенного исследования установили наличие прорегенераторных свойств у нового производного АК – 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ при его местном применении в форме мази для обработки термических ожогов кожи крыс, что свидетельствует о перспективности проведения полномасштабных доклинических и клинических исследований данной мази с целью ее последующего практического применения.

### **Методология и методы исследования**

Крысам основной и контрольных групп проводили экспериментальное моделирование термических ожогов кожи с соблюдением требуемых гуманных подходов при работе с животными и лабораторные биохимические исследования.

В работе использованы методы теоретического познания (анализ, синтез, сравнение, построение гипотез), методы эмпирического характера (изучение научной литературы, наблюдение, измерение), математические методы (статистический анализ).

## **Положения, выносимые на защиту**

1. 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (ацексамат) обладает прорегенераторными свойствами при применении в виде курса ежедневных аппликаций на термические ожоги кожи крыс.

2. Прорегенераторная активность 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата ассоциирована со снижением выраженности свободнорадикальных реакций и протеолитической активности MMP-9 в регенерирующих тканях.

3. Существует достоверная взаимосвязь между площадями раневых дефектов и уровнями MMP-9/TIMP-1 в тканях, а также между уровнями MMP-9/TIMP-1 и индексом оксидативного стресса (ИОС) в тканях у животных, получавших на ожоговые раны курс аппликаций 2% мазью 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, в фазы воспаления и пролиферации.

4. Прорегенераторная активность нового производного N-A-6-АГ кислоты и ассоциированные с репарацией обнаруженные изменения биохимических показателей обусловлены местным действием вещества на регенерирующие ткани.

## **Степень достоверности результатов исследования**

Достоверность результатов подтверждается применением стандартной методики эксперимента по моделированию термических ожогов у крыс, использованием объема выборки животных, рассчитанного методами математической статистики, рациональным выбором методов исследования, использованием высоко чувствительных и специфичных наборов реактивов для лабораторных исследований, современного сертифицированного лабораторного оборудования, хранением полученных в настоящем исследовании результатов в компьютерной базе данных в программе Microsoft® Office® Excel® 2016, использованием адекватных методик статистической обработки данных исследования с помощью IBM® SPSS® Statistics 23.0, публикацией в рецензируемых научных журналах результатов исследования и их апробацией на многочисленных научных конференциях. Первичная документация результатов

проведенного исследования проверена комиссией (акт проверки первичной научной документации от 26 апреля 2021 года).

### **Апробация материалов работы**

Результаты исследования в форме стендовых и устных докладов представлены на 7 российских и международных научно-практических конференциях:

- V межвузовская научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и медицинская наука», 2017, Тверь (устный доклад) – диплом III степени;
- VII Межвузовская научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и медицинская наука», 2019, Тверь (устный доклад);
- VIII Межвузовская научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и медицинская наука», 2020, Тверь (устный доклад) – диплом I степени;
- Международный научно-исследовательский конкурс «Исследователь года 2020», Петрозаводск (устный доклад) – диплом I степени;
- XXII Международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке: глобальные вопросы и проблемы современности в аспекте модернизации в медицине и образовании», 2020, Москва (стендовый доклад) – диплом III степени;
- XV Международная научно-практическая конференция молодых ученых-медиков «СОВА», 2021, Курск (устный доклад) – диплом I степени;
- Всероссийская научная конференция с международным участием «Регенеративная биология и медицина», 2021, Москва (стендовый доклад).

Апробация материалов диссертационной работы проведена на расширенном заседании кафедр биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, химии, биологии, гистологии, эмбриологии и цитологии, патологической анатомии, фармакологии и клинической фармакологии, управления и экономики фармации с курсами фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармацевтической и токсикологической химии, патологической

физиологии, физиологии с курсом теории и практики сестринского дела, общей хирургии, факультетской терапии, госпитальной терапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России) от 22 декабря 2021 года, протокол № 1.

### **Внедрение результатов исследования**

Методики определения общей оксидантной и антиоксидантной активности, концентраций ММР-9 и ТМР-1, а также данные об их динамике в ходе процесса регенерации термических ожогов кожи у животных используются в учебном процессе на кафедре управления и экономики фармации с курсами фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России и кафедре зоологии и физиологии ФГБОУ ВО «Тверской государственной университет» Минобра России.

На апробированную в ходе исследования методику эксперимента по моделированию термических ожогов кожи у крыс, используемую в работе кафедры биологии и вивария ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, оформлено «ноу-хау» – Петрова М.Б., Егорова Е.Н., Андрианова Е.В., Петровская М.А. Способ подготовки операционного поля для создания экспериментальной модели термического ожога кожи. – Тверь, Тверской ГМУ, Свидетельство ноу-хау № 01-147-2020 от 26.02.2020.

По материалам исследования оформлены объекты интеллектуальной собственности:

база данных Малыгин А.С., Богомоллова О.А., Андрианова Е.В., Демидова М.А. «Характеристика масс-спектров новых лекарственных средств из группы производных пропиленпентановой и аминоксепановой кислот» (свидетельство о государственной регистрации № 2020620659 от 09.04.2020 г.)

патент на изобретение Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В., Блинов Д.С., Пахомов Д.В., Кильмяшкина М.Ф., Шимановский Д.Н., Петрова

М.Б., Егорова Е.Н., Андрианова Е.В., Петровская М.А., Желтухин Н.К., Коротоножкин А.В. Мазь для лечения ожогов 1-3 степени // Патент на изобретение № 2731175 зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 31.08.2020 г.

### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Лично Андриановой Е.В. выполнены: анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме диссертации, формулировка цели и задач исследования, выполнение эксперимента, набор фактического материала в ходе эксперимента и его обработка, выполнены лабораторные биохимические исследования, составлена база данных полученных результатов по группам исследования, выполнена статистическая обработка полученных результатов, написан текст диссертации, самостоятельно сформулированы выводы и практические рекомендации по результатам проведенного исследования, подготовлены статьи для публикации, устные и стендовые доклады для выступлений на научно-практических мероприятиях.

### **Публикации**

Основные положения диссертации опубликованы в 16 научных работах, из которых 3 – статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, 1 – патент РФ, 1 – база данных, 11 – статьи и материалы научных конференций, опубликованные в других изданиях. Также получено 1 свидетельство ноу-хау.

#### *Научные статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ*

1. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Петровская М.А., Скачилова С.Я. // Динамика металлопротеиназной активности как показатель прорегенеторных свойств нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при лечении ожогов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, № 10. – С. 46-52.

2. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Пахомов М.А. Биохимические аспекты прорегенераторного действия 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 1. – С. 12-16.

3. Попов Н.С., Егорова Е.Н., Петрова М.Б., **Андрианова Е.В.**, Шикунова О.А. Применение ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 10. – С. 45-51.

#### Патент РФ

4. Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В., Блинов Д.С., Пахомов Д.В., Кильмяшкина М.Ф., Шимановский Д.Н., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., **Андрианова Е.В.**, Петровская М.А., Желтухин Н.К., Коротоножкин А.В. Мазь для лечения ожогов 1-3 степени // Изобретения. Полезные модели (официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности (РОСПАТЕНТ)). – 2020. – № 25. Патент на изобретение RU 2731175 С1 зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 31.08.2020 г.

#### База данных

5. Малыгин А.С., Богомолова О.А., **Андрианова Е.В.**, Демидова М.А. Характеристика масс-спектров новых лекарственных средств из группы производных пропиопентановой и аминогексановой кислот // Программы для ЭВМ. Базы данных. Топологии интегральных микросхем (официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности (РОСПАТЕНТ)). – 2020. – № 4. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020620659 от 09.04.2020 г.

Статьи и материалы научных конференций, опубликованные в других изданиях

6. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н. Оксидативный стресс в патогенезе заболеваний // Материалы V Межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука».

– Тверь : РИЦ ТГМУ, 2018. – С. 30-34.

7. Прохоров И.В., Городничев К.И., **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н. Терапевтический потенциал производных ацексамовой кислоты // Материалы 65-й Всероссийской межвузовской студенческой научной конференции с международным участием. – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2019. – С. 797-799.

8. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н. Производные ацексамовой кислоты и их биохимические эффекты // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2019. – Т. 35, № 1. – С. 164-169.

9. **Андрианова Е.В.**, Петровская М.А., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., Скачилова С.Я., Павлова Н.В., Харитоновна Е.А. Динамика показателей оксидативного стресса и планиметрическая оценка ожоговых ран при лечении новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 3. – С.1-8; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=29741>.

10. **Andrianova E.V.**, Petrovskaya M.A., Egorova E.N., Petrova M.B., Skachilova S.Y. Evaluation of dynamics of metalloproteinase activity and indicators of oxidative stress in the treatment of burns with a new derivative of N-acetyl-6-aminohexanoic acid // Science. Education. Practice : Materials of the International University Science Forum (Canada, Toronto, April 22, 2020). – 2020. – С. 137-143.

11. **Андрианова Е.В.**, Горбунова Д.В., Пахомов М.А. Биохимические механизмы действия антиоксидантов // Материалы I межвузовской научно-практической конференции «Химия в медицине: опыт, проблемы, перспективы». – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2020. – С. 9-12.

12. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б. Металлопротеиназная активность тканей крыс при лечении термических ожогов мазью с новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты // Материалы IV Международного научно-исследовательского конкурса «Исследователь года 2020». – Петрозаводск. – С. 268-274.

13. **Андрианова Е.В.** Биохимические механизмы прорегенераторного действия нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при лечении ожогов у крыс // Natural resources of the Earth and environmental protection:



материалы XXII Международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке: глобальные вопросы и проблемы современности в аспекте модернизации в медицине и образовании». – Vol. 1., № 7, 8, 9. – 2020. – С. 42-46.

14. **Андрианова Е.В.**, Петровская М.А., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., Горбунова Д.В. Планиметрическая оценка и динамика показателей оксидативного стресса при лечении термического ожога у крыс новым производным ацетиламиногексановой кислоты // Материалы VII Всероссийской межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука». – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2020. – С. 39-42.

15. **Андрианова Е.В.**, Горбунова Д.В., Петровская М.А. Протеолитическая активность тканей из области термических ожогов при их лечении мазью с новым производным ацетсамовой кислоты у крыс // Материалы VIII межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука». – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2020. – С. 8.

16. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б. Корреляция металлопротеиназной активности и выраженности оксидативного стресса в процессе регенерации термических ожогов кожи крыс при лечении новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина» г. Москва. – 2021. – С. 33-34.

Объект интеллектуальной собственности (свидетельство ноу-хау)

Петрова М.Б., **Егорова Е.Н.**, Андрианова Е.В., Петровская М.А. Способ подготовки операционного поля для создания экспериментальной модели термического ожога кожи. – Тверь, Тверской ГМУ, Свидетельство ноу-хау № 01-147-2020 от 26.02.2020.

**Объем и структура работы**

Диссертационная работа изложена на 139 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов исследования, выводов, практических рекомендаций, списка используемых

сокращений, списка литературы. Список литературы содержит 222 источника, из них 99 отечественных и 123 зарубежных авторов. Диссертационная работа содержит 21 таблицу и иллюстрирована 29 рисунками.

Автор признательна руководителю отдела химии и технологии синтетических лекарственных средств АО «ВНЦ БАВ», лауреату Государственной премии РФ, д.х.н., профессору С.Я. Скачиловой за любезно предоставленное новое производное N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат, а также выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой биологии д.б.н., профессору М.Б. Петровой за помощь при проведении эксперимента на животных, заведующей кафедрой управления и экономики фармации с курсами фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармацевтической и токсикологической химии, д.м.н., профессору М.А. Демидовой за помощь в изготовлении мази, содержащей данное производное, и заведующему научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России к.фарм.н. Н.С. Попову за неоценимую помощь в выполнении ВЭЖХ-масс-спектрометрии для определения резорбции исследуемого вещества из мази.

## ГЛАВА 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Структура и биологические эффекты N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и ее производных

##### 1.1.1. Структура N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и ее производных

N-ацетил-6-аминогексановая (ацексамовая, ε-ацетамидокапроновая) кислота является производным аминокaproновой кислоты. Ацетиламиногексановая и аминокaproновая кислоты широко используются в медицине [57]. Известно, что аминокaproновая кислота способна блокировать активаторы плазминогена, предотвращая частичный протеолиз последнего и, следовательно, фибринолитическое действие плазмина [185], то есть является гемостатическим средством. N-ацетил-6-аминогексановая кислота (N-A-6-АГК), подобным свойством не обладает [109], несмотря на схожесть в строении (рисунок 1).

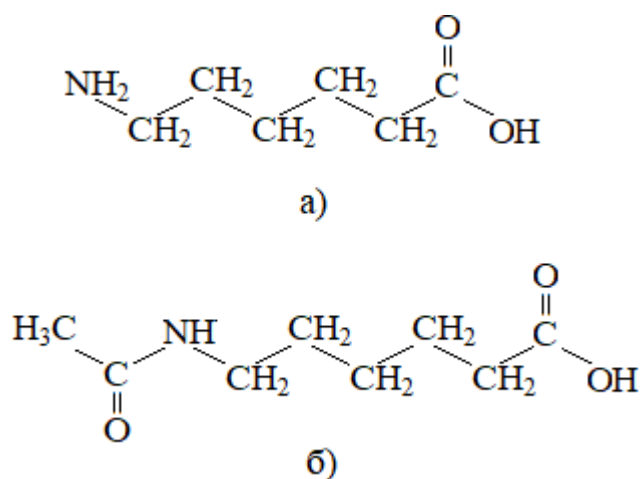
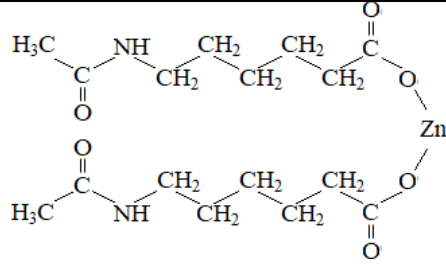
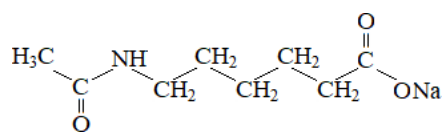
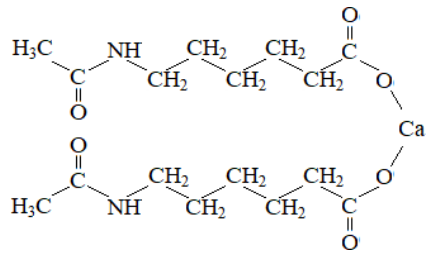
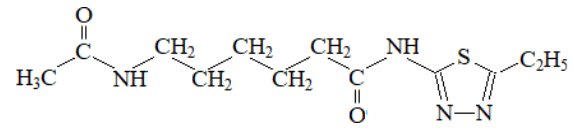
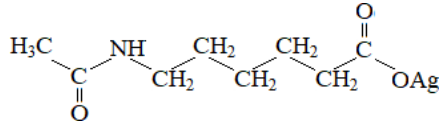
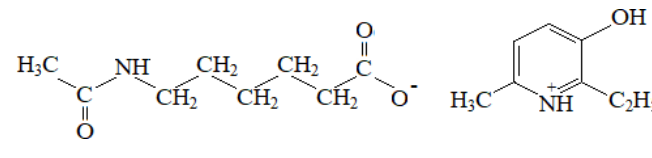


Рисунок 1 – Химическая структура: а) аминокaproновой кислоты; б) N-ацетиламиногексановой кислоты

За последние несколько лет учеными были получены данные о действии на организм производных N-A-6-АГК, обладающих биологической активностью, формулы некоторых из них приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Производные ацетиламиногексановой кислоты

Название	Структура соединения
N-Ацетил-6-аминогексаноат цинка (цинковая соль ε-ацетамидокапроновой кислоты)	
N-Ацетил-6-аминогексаноат натрия (натриевая соль ε-ацетамидокапроновой кислоты)	
N-Ацетил-6-аминогексаноат кальция	
2-(5-этил-1,3,4-тиадиазолил)амид N-ацетил-6-аминогексановой кислоты	
N-Ацетил-6-аминогексаноат серебра	
2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат	

### **1.1.2. Биологические эффекты N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и ее производных**

N-A-6-АГК, благодаря широкому спектру биологической активности – способности очищать раневые поверхности от некротических масс, уменьшать экссудацию, активировать рост грануляционной ткани, васкуляризацию и эпителизацию ран, предупреждать развитие келоидных рубцов – относят к фармакологической группе веществ «Регенеранты и репаратанты». Так, например, существующая лекарственная форма АК – мазь под названием «Ацемин» – применяется для репарации поврежденных тканей [9, 17]. Стимулирующий эффект данного препарата, проявляющийся в сокращении сроков регенерации полнослойных дефектов кожи, был выявлен Петровой М.Б., Хомуло Г.В. в 2011 году [65].

«Ацемин» на липофильной мазевой основе предназначен для применения в хирургии при лечении ран, полученных от укусов. Доказано, что применение данного препарата способствует предотвращению образования корковой поверхности и келоидных рубцов [92]. Показан эффективный результат использования препарата «Ацемин» при комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта. После двух-трехкратного применения повязок на основе 5% мази уменьшались отечность, гиперемия, кровоточивость десен. Препарат применяли в виде 25% раствора и 5% мази на основе ацексамовой кислоты вместе с оксидом цинка и искусственного дентина в соотношении 1:1 [9].

Проведенные исследования препаратов, содержащих N-A-6-АГК, показали наличие у нее репаративного потенциала, но, с клинической точки зрения, недостаточного для практического применения. В связи с этим в настоящее время N-A-6-АГК в виде лекарственной формы в России не производится. Однако данное вещество является основой для синтеза новых его производных, обладающих потенциально более активными прорегенераторными свойствами по сравнению с исходным [48, 69].

Первые сообщения о синтезе производных N-A-6-АГК – комплексных солей N-ацетил-6-аминогексаноата кальция и N-ацетил-6-аминогексаноата магния относятся к 1976 году, когда они были синтезированы и запатентованы в США (патент US 3974215). Однако доклинические и клинические исследования этих производных не проводились [135].

По данным зарубежных научных публикаций наиболее часто в медицинской практике используется цинковая соль N-A-6-АГК (ацексамат цинка или N-ацетил-6-аминогексаноат цинка) [202]. Результаты проведенных исследований позволили сделать вывод о целесообразности применения цинковой соли ацексамовой кислоты в качестве терапевтического средства при ишемии почек, поскольку при ее введении значительно снижалась выраженность оксидативного стресса и воспалительной реакции. Авторы считают, что ионы цинка, которые высвобождается из комплексной соли, способствуют усилению активности антиоксидантных ферментов. Однако необходимо строго соблюдать дозировку препарата, т.к. при избытке цинковой соли ацексамовой кислоты такого эффекта не наблюдается.

В Российской Федерации большую работу по синтезу новых производных N-A-6-АГК проводит д.х.н., профессор С.Я. Скачилова, под руководством которой были получены многочисленные субстанции, некоторые из которых, указанные ниже, продемонстрировали биологическую эффективность.

Н.С. Поповым и соавт. (2018 г.) были проведены исследования нового производного N-A-6-АГК – этилтиазолиламида (2-(5-этил-1,3,4-тиадиазолил)амид N-ацетил-6-аминогексановой кислоты) и было показано, что данное вещество обладает противовоспалительными свойствами [57, 69].

В настоящее время с медицинской точки зрения представляют интерес новые производные ацексамовой кислоты – комплексные соли – N-ацетил-6-аминогексаноат серебра и N-ацетил-6-аминогексаноат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния. Обнаружено, что данные производные стимулируют регенерацию и минерализацию костной ткани при остеопорозе, что подтверждено патентом 2018 г. RU 2668966 [60].

Д.В. Пахомовым и соавт. (2020 г.) опубликованы результаты исследования, показавшие при местном применении наличие у серебряной соли N-ацетил-6-аминогексановой кислоты свойств, стимулирующих заживление неосложненных плоских ран кожи у крыс, которое сопровождалось снижением активности воспалительного процесса, ускорением пролиферативно-регенерационных процессов, активации васкуляризации ран и формированием рубца первичным натяжением [27].

Среди производных 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина известен ряд препаратов с широким спектром биологической активности. Для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата показано наличие анксиолитического и ноотропного действия [59]. Сукцинат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина («Мексидол»), синтезированный Л.Д. Смирновым и В.И. Кузьминым в начале 1980-х годов в ГУ НИИ Фармакологии РАМН, восстанавливает нейромедиаторный баланс, регулирует функционирование рецепторов и мембрано-связанных ферментов, а также обладает антиоксидантными свойствами [19].

Таким образом, N-A-6-АГК и, особенно, ее производные в настоящее время исследуются как средства, стимулирующие регенерацию кожи, внутренних органов и костной ткани, благодаря их способности ускорять очищение раневой поверхности от некротических масс, уменьшать воспаления в ране, ускорять рост грануляционной ткани, стимулировать васкуляризацию, эпителизацию ран и образование костной мозоли [32, 9, 17].

## **1.2. Биохимия оксидативного стресса и его биологическое значение**

### **1.2.1. Оксиданты. Продукты перекисного окисления**

Основой биоэнергетики всех аэробных форм жизни является реакция восстановления кислорода – одного из самых распространенных химических элементов в природе [90].

В реакциях окисления при последовательном присоединении четырех электронов  $O_2$  полностью восстанавливается с образованием воды. Присоединение первого электрона к кислороду ведет к образованию

супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ). При присоединении второго электрона образуется пероксид водорода ( $H_2O_2$ ). Присоединение третьего электрона ведет к образованию чрезвычайно реакционно-способного гидроксильного радикала ( $\cdot OH$ ). Присоединение последнего электрона способствует образованию воды (рисунок 2).

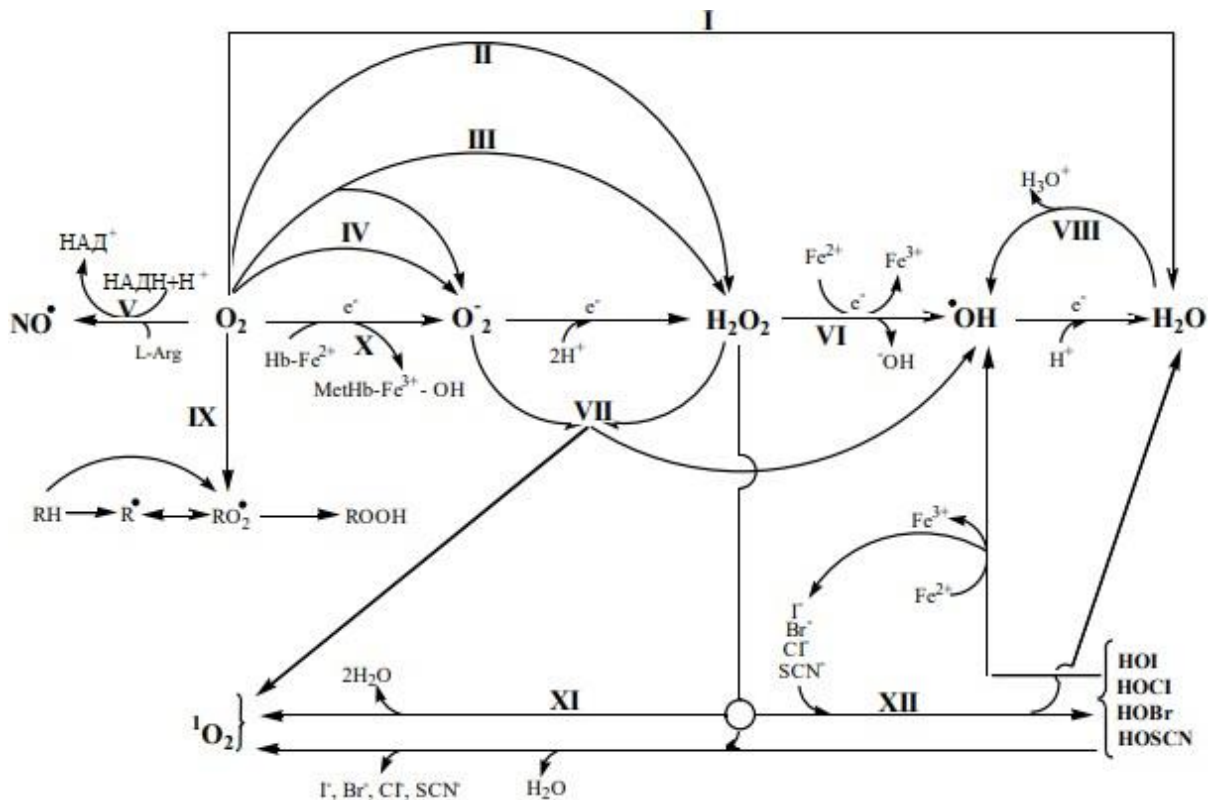


Рисунок 2 – I – цитохром-с-оксидаза; II – флавиновые оксидазы; III – ксантиноксидаза; IV – НАДФН – оксидаза; V – NO-синтаза; VI – реакция Фентона; VII – реакция Хабера-Вейса; VIII – воздействие радиации; IX – перекисное окисление липидов; X – неферментативное окисление гемоглобина; XI – каталаза; XII – миелопероксидаза [36]. Активные формы кислорода (АФК) можно разделить на две группы: нерадикальные и радикальные (таблица 2).

Супероксидный анион-радикал является первым из промежуточных продуктов цепи последовательных одноэлектронных реакций восстановления молекулярного кислорода.



Таблица 2 – Активные формы кислорода и прооксиданты, присутствующие в живых организмах [47, 51, 90]

Нерадикальные формы		Свободные радикалы	
Название	Химическая формула	Название	Химическая формула
Синглетный кислород	$^1\text{O}_2$	Супероксидный анион-радикал	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Гидроксидный анион	$\text{HO}^-$	Гидроксидный Радикал	$\text{HO}^\cdot$
Гидропероксидный анион	$\text{HOO}^-$	Гидропероксидный Радикал	$\text{HOO}^\cdot$
Пероксид водорода	$\text{H}_2\text{O}_2$	Липоксидный радикал	$\text{LO}^\cdot$
Пероксинитрит	$\text{ONOO}^-$	Нитрозил-радикал	$\text{NO}^\cdot$
Липидный гидропероксид	$\text{LOOH}$	Липопероксидный Радикал	$\text{LOO}^\cdot$
Хлорноватистая кислота	$\text{HOCl}$		

Восстановление  $\text{O}_2$  катализируется мембранной НАДФН-оксидазой с образованием супероксидного анион-радикала:  $\text{O}_2 \rightarrow + e^- \text{O}_2^{\cdot-}$  [40, 54, 97]. Особенностью супероксидного анион-радикала является то, что он способен образовывать различные продукты реакции в зависимости от реакции среды [66, 144, 197]. Так, в кислой среде он превращается в пероксид водорода, при кислотнo-щелoчном равновесии – в гидропероксидный радикал:  $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOO}^\cdot$  [10].

Пероксид водорода, кроме указанного выше способа, может образовываться в реакции протонирования двух молекул супероксид-анион-радикалов:  $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . Данная реакция возможна при участии фермента супероксиддисмутазы (СОД), а также при спонтанной дисмутации радикалов. Константа скорости спонтанной дисмутации супероксидного анион-радикала в пероксид водорода приблизительно равна  $2 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Константа скорости каталитической дисмутации супероксидного анион-радикала в пероксид водорода равна  $2 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , то есть контролируемая супероксиддисмутазой реакция происходит намного быстрее спонтанной, и, следовательно, является основным источником перекиси водорода [38, 164,

193]. Пероксид водорода при взаимодействии с металлами переменной валентности способен генерировать высокореактивные АФК (такие как гидроксильный радикал, гидроксид-анион, супероксидный анион-радикал). За счет того, что молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  неионизирована, она может сравнительно легко диффундировать сквозь мембраны клеток [90, 178].

Гидроксильный радикал обладает чрезвычайно высокой окислительной способностью. Генерация  $\text{HO}^\bullet$  в организме происходит разными путями, например [66, 90]:

- в реакции Хабер-Вейса:  $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{HO}^- + \text{O}_2$ ;
- в реакции Фентона:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$ ;
- при распаде пероксинитрита:  $\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{ONOOH} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{NO}_2$

Агрессивные радикалы  $\text{HO}^\bullet$  взаимодействуют с широким спектром органических молекул – фосфолипиды мембран, белки, нуклеиновые кислоты [22, 38].

Гипохлорит-анион ( $\text{OCl}^-$ ) генерируется при диссоциации хлорноватистой кислоты ( $\text{HOCl}$ ), образованной при взаимодействии перексида водорода с хлорид-анионами при участии гемсодержащего фермента лизосом – миелопероксидазы. Гипохлорит-ион является сильным окислителем, сопоставимым с гидроксильным радикалом. Реагируя с аминокеттами мембранных белков,  $\text{OCl}^-$  образует хлорамины [38]. Кроме этого, гипохлорит-ионы способны генерировать гидроксил-радикалы в реакции с супероксид-анионом. Под действием миелопероксидазы происходит образование других гипогалоидных кислот ( $\text{HOBr}$ ,  $\text{HOI}$ ), обладающих высокой химической активностью в отношении органических молекул. Анионы гипогалоидных кислот способны окислять сульфгидрильные, тиоэфирные группы белков, а также железосерные и гемовые группы ферментов [34].

К азотсодержащим АФК относятся оксид азота (II) или нитрозил-радикал ( $\text{NO}^\bullet$ ) и пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ).  $\text{NO}^\bullet$  образуется в результате окисления L-аргинина, катализируемого NO-синтазами (NOS) при участии кислорода (рисунок 3).

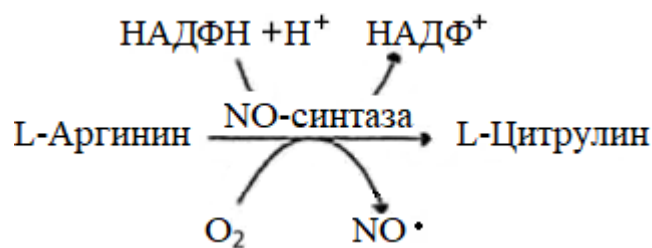


Рисунок 3 – Образование нитрозил-радикала [36].

Среди NO-синтаз выделяют нейрональную (nNOS), локализованную в нервной ткани, эндотелиальную (eNOS) – в эндотелии, и индуцибельную (iNOS) – в клетках иммунной системы, гепатоцитах, эндотелии других [149].

Нитрозил-радикал в физиологических условиях ингибирует агрегацию тромбоцитов, расслабляет гладкую мускулатуру, в том числе, кровеносных сосудов, является нейромедиатором, регулирует апоптоз, тормозит опухолевый рост [165].

Пероксинитрит образуется при взаимодействии супероксидного анион-радикала с нитрозил-радикалом:  $\text{O}_2^{\cdot -} + \text{NO}\cdot \rightarrow \text{ONOO}^-$ . Предполагается, что в физиологических условиях  $\text{ONOO}^-$  является сигнальной молекулой, участвующей в регуляции активности ферментов (протеинкиназы В и С, ксантиноксидазы, сукцинатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы и др.) [1].

Окислительному действию пероксинитрита подвергаются аминокислотные остатки белков (Цис, Мет, Три, Тир), азотистые основания и углеводные остатки, входящие в состав нуклеиновых кислот, причем избыточное накопление  $\text{ONOO}^-$  может привести к разрыву нитей ДНК, с образованием 8-нитрогуанина из 8-оксогуанина. Нитрозил-радикал и пероксинитрит участвуют в перекисном окислении липидов с образованием нитрозилированных и нитрованных липидов [1].

Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ ) – возбужденная, высокоэнергетическая форма  $\text{O}_2$ , образуется под действием солнечного света, ультрафиолетового, ионизирующего излучений, в фотовозбуждаемых процессах переноса энергии от окрашенных молекул (метиленовый синий,

порфирины), в реакции взаимодействия пероксида водорода с гипохлоритом [46, 47, 97]. Установлено, что синглетный кислород окисляет холестерин, фосфолипиды в липопротеинах низкой плотности (ЛПНП), которые в окисленной форме распознаются скавенджер(scavenger)-рецепторами фагоцитов, и запускают каскад внутриклеточных сигнальных событий, приводящих к дисфункции эндотелия и развитию атеросклероза. Синглетный кислород является действующим фактором при фотодинамической терапии, используемой для лечения артеросклероза, рестеноза после ангиопластики, а также злокачественных новообразований [47].

АФК обладают высокой активностью, имеют короткий полупериод жизни (таблица 3), инициируют каскад свободнорадикальных реакций. При избыточной генерации *in vivo*, в высоких концентрациях АФК могут вызвать значительные повреждения липидов, белков и нуклеиновых кислот [90, 145, 190].

АФК активно взаимодействуют с фосфолипидными структурами биологических мембран. Свободные радикалы, образующиеся в билипидном слое клеточных мембран при перекисном окислении липидов (ПОЛ), в физиологических условиях способствуют регуляции липидного состава мембран (изменению проницаемости мембран, адаптации клетки к изменяющимся условиям окружающей среды), процессу обновления мембран и биосинтезу эйкозаноидов [38, 47].

Таблица 3 – Полупериод жизни некоторых свободных радикалов в сравнении с молекулярным кислородом [90]

Название	Формула	Полупериод жизни при 37°C, с
Супероксидный анион-радикал	$O_2^{\cdot-}$	$1 \times 10^{-6}$
Гидроксидный радикал	$HO^{\cdot}$	$1 \times 10^{-9}$
Липоксидный радикал	$LO^{\cdot}$	$1 \times 10^{-6}$
Липопероксидный радикал	$LOO^{\cdot}$	$1 \times 10^{-2}$
Синглетный кислород	$^1O_2$	$1 \times 10^{-6}$
Молекулярный кислород	$O_2$	$> 10^2$

Однако, в случае отсутствия достаточного количества антиоксидантов и образования большого количества свободных радикалов при оксидативном стрессе, ПОЛ оказывает патологические эффекты [51, 86]. ПОЛ-индуцирующими факторами являются ишемия, реперфузия тканей, воспаление, в том числе, асептическое и недостаточная активность (относительная или абсолютная) физиологической антиоксидантной системы [20, 89,90]. Активация ПОЛ характерна для многих заболеваний, таких как злокачественные новообразования, атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Паркинсона, эпилепсия, дистрофия мышц [77, 78, 105, 180]. Изменение структуры тканей в результате ПОЛ можно наблюдать на коже с возрастом при появлении пигментных пятен на коже [20, 90].

Процесс ПОЛ условно разделяют на четыре стадии: инициирование цепи, развитие цепных реакций, разрушение структуры окисленных липидов и обрыв цепи. На стадии инициирования цепи иницирующие свободные радикалы выступают в роли акцепторов протона с образованием радикальных центров в полиненасыщенных жирных кислотах. При развитии цепных реакций происходит образование липопероксидных радикалов ( $LOO\cdot$ ) за счет взаимодействия молекулярного кислорода с жирными кислотами, содержащими радикальный центр, и дальнейшее образование диеновых конъюгатов и липидного гидропероксида ( $LOOH$ ). Стадия разрушения структуры окисленных липидов характеризуется каскадом окислительно-восстановительных реакций, приводящих к образованию конечных продуктов ПОЛ – кетонов, альдегидов, эпоксидов, гипопероксидов кислот и малонового диальдегида. Каскад окислительно-восстановительных реакций может быть остановлен при взаимодействии свободных радикалов между собой или при действии на них антиоксидантов, что приводит к обрыву цепи [36, 189]. В результате ПОЛ образуются межлипидные, межбелковые и липид-белковые поперечные сшивки, липидная фаза мембраны становится более ригидной, вследствие чего снижается функциональная активность ферментов, рецепторов и каналобразующих белков, встроенных в мембраны [20, 47, 67].

В условиях оксидативного стресса происходит окислительная модификация белковых молекул, при которой свободные радикалы атакуют белки в различных участках, приводя к нарушениям первичной, вторичной и третичной структур белков. Окислению подвергаются белки, содержащие свободные SH-группы, COOH-группы или металлы с переменной валентностью. В процессе окислительной модификации белковых молекул образуются различные стабильные метаболиты аминокислот, в том числе Шиффовы основания [36].

Радикалы, генерируемые при ПОЛ, также оказывают повреждающее действие на молекулы ДНК. Взаимодействие гидроксид-радикала с пуриновыми основаниями и селективное взаимодействие супероксид-аниона с гуаниновыми основаниями приводит к образованию оксопроизводных. Конечными продуктами окисления пуриновых оснований является 7,8-дигидро-8- гидроксигуанозин, 4,6-диамино-5-формапидопиримидин и 2,6-диамино-4-окси-5-формапидопиримидин. Гидроксид-радикал способен окислять дезоксирибозу и рибозу [90]. В молекулах ДНК могут индуцироваться процессы хромосомных aberrаций при воздействии АФК [36].

При ряде заболеваний усиливается окисление углеводов, которому подвергаются моносахариды с образованием дикарбонильных соединений и пероксида водорода. Кетоальдегиды и оксиальдегиды, образующиеся при окислении альдоз, способны взаимодействовать с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, входящего в состав белков, модифицируя их и формируя более стабильные, функционально неактивные, гликированные соединения, называемые основаниями Шиффа и продуктами Амадори [90].

### 1.2.2. Антиоксиданты

В физиологических условиях действию системы свободнорадикального окисления противостоит мощная многокомпонентная антиоксидантная система (АОС), выполняющая защитную функцию, участвующую в различных видах обмена веществ и контролирующую уровень АФК [1, 79, 86]. Антиоксидантная способность веществ позволяют эффективно регулировать функции цепи

переноса электронов, находящейся на внутренней мембране митохондрий [40, 94, 99].

Антиоксиданты (АО) – вещества, обладающие способностью реагировать с активными формами кислорода и частично или полностью инактивировать их [7, 33, 139]. На рисунке 4 схематично изображен механизм действия АО.

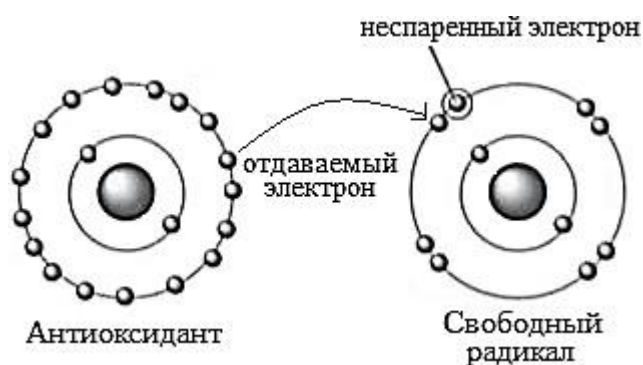


Рисунок 4 – Механизм действия некоторых антиоксидантов, снижающих активность свободных радикалов при передаче электрона на внешний электронный уровень последних [140]

По способу действия АО классифицируют на вещества косвенного и прямого действия, которые в отличие от первых определяются в тестах *in vitro* [1, 77].

Для АО косвенного действия характерны такие механизмы, как активация ферментов АОС, угнетение процессов, приводящих к накоплению АФК, смещение процессов свободнорадикального окисления в сторону образования менее реакционно-способных соединений и т.д. [1, 56, 166]. Например, к ним относится восстановленная форма кофермента НАДФН+Н<sup>+</sup>, основным источником которой является окислительная стадия пентозофосфатного пути. НАДФН+Н<sup>+</sup> способен восстанавливать глутатион, обладающий свойствами антиоксиданта прямого действия.

АО прямого действия, в свою очередь, подразделяют на пять классов: донаторы протона, полиены, катализаторы или «имитаторы ферментов», «ловушки» радикалов и комплексообразователи (хелаторы) [11, 90].

Донаторы протона – наиболее обширная группа АО, применяемая в медицине. К ним относятся тиолы, фенолы, гетероциклические азотсодержащие вещества, порфирины,  $\alpha$ ,  $\beta$ -диенолы. Из них фенолы (токоферол, флавоноиды, катехины, эстрогены, ионол (синтетический АО, используемый в производстве), пробукол, лазароиды и др.) вступают в реакции с радикалами, образуемыми в процессе ПОЛ, за счет легкоподвижного атома водорода, таким образом, выраженно угнетая реакции ПОЛ [90, 105, 203]. Свойства фенолов зависят от присутствия в среде катионов металлов с переходной валентностью (Fe, Cu, Mn и др.) [11, 106, 191]. Азотсодержащие гетероциклические вещества по механизму действия схожи с фенолами: атом водорода, связанный с азотом в составе ароматического гетероцикла, обладает высокой подвижностью. К ним относят мелатонин, 1,4-дигидропиридин и его производные, 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин [12, 90]. Тиолы (глутатион, цистеин, гомоцистеин, N-ацетилцистеин, дигидролипоевая кислота) могут быть как донаторами протона, так и хелаторами катионов переходных металлов [75]. К порфиринам относится билирубин. Порфирины способны не только отдавать протоны, но также, выступать в роли катализаторов и комплексообразователей [94, 99, 107].

Полиены – вещества с ненасыщенными связями, легко окисляются и конкурируют с фосфолипидами мембран за АФК, тем самым, участвуя в АОС организма. Представителями данной группы АО является ретинол и его производные, каратиноиды [11, 90].

Катализаторы, или «имитаторы ферментов», ускоряют нейтрализацию промежуточных продуктов свободнорадикального окисления и не подвергаются распаду в процессе инактивации АФК. К ним относятся имитаторы супероксиддисмутазы (нитроксилы и аминоксилы), имитаторы глутатионпероксидазы (эбселен, теллурсодержащие соединения) [90, 94].

«Ловушки» радикалов – вещества радикальной природы с невысокой реакционной способностью, угнетающие практически все звенья свободнорадикального окисления, нейтрализуя первично образующиеся АФК (фенил-трет-бутилнитрон и другие нитроны) [94].



Комплексообразователи (хелаторы) подавляют металлозависимые реакции свободнорадикального окисления. Хелаторы способны связывать металлы переходной валентности, предотвращая образование новых АФК. К ним относят этилендиаминтетрауксусную кислоту и ее соли, карнозин, некоторые флавоноиды [94, 99].

АО классифицируются на ферментативные и неферментативные. К ключевым антиоксидантным ферментам относятся супероксиддисмутаза, каталаза и глутатион-пероксидаза [89, 100, 105]. Для ферментативных АО характерна высокая избирательность действия и специфичность клеточной и органной локализации. В физиологических условиях содержание таких АО относительно постоянно. В условиях гипоксии и гипероксии, при образовании большого количества АФК, повышается уровень ферментативных АО внутри клеток. С возрастом наблюдается некоторое снижение концентрации ферментативных АО [1, 134, 141]. Синтез, активность и концентрация таких антиоксидантов находится под генетическим контролем и изменяется при различных патологиях [156, 176].

Супероксиддисмутаза (СОД) является важным представителем антиоксидантной системы (АОС), она катализирует превращение супероксидного анион-радикала  $O_2^{\cdot -}$  в пероксид водорода  $H_2O_2$  и молекулярный кислород  $O_2$  [184, 187, 215].

Каталаза является гемопротеином ( $Fe^{3+}$ ), находится в пероксисомах и цитоплазме клеток, где катализирует реакцию разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Последовательное действие ферментов АОС представлено на рисунке 5.

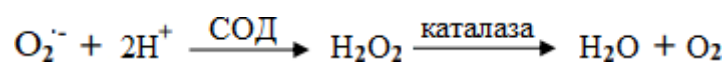


Рисунок 5 – Реакции, катализируемые СОД и каталазой

Токоферол (витамин Е) взаимодействует с  $HO^{\cdot}$ , нейтрализует синглетный кислород, инактивирует  $O_2^{\cdot -}$ , ингибирует липидные радикалы и блокирует

радикальные реакции, вызванные действием озона. Существует 8 типов токоферолов, однако  $\alpha$ -токоферол наиболее активен [34]. Витамин E является донором водорода для липопероксидного радикала (рисунок 6). Таким образом, образуется липидный гидропероксид LOOH и останавливается ПОЛ. После потери атома водорода витамин E превращается в стабильный свободный радикал, активно взаимодействующий с радикалами липидных перекисей. После его взаимодействия с липидными перекисями он окисляется до токоферилхинона. Механизм окисления  $\alpha$ -токоферола представлен на рисунке 6 [29, 79, 103].

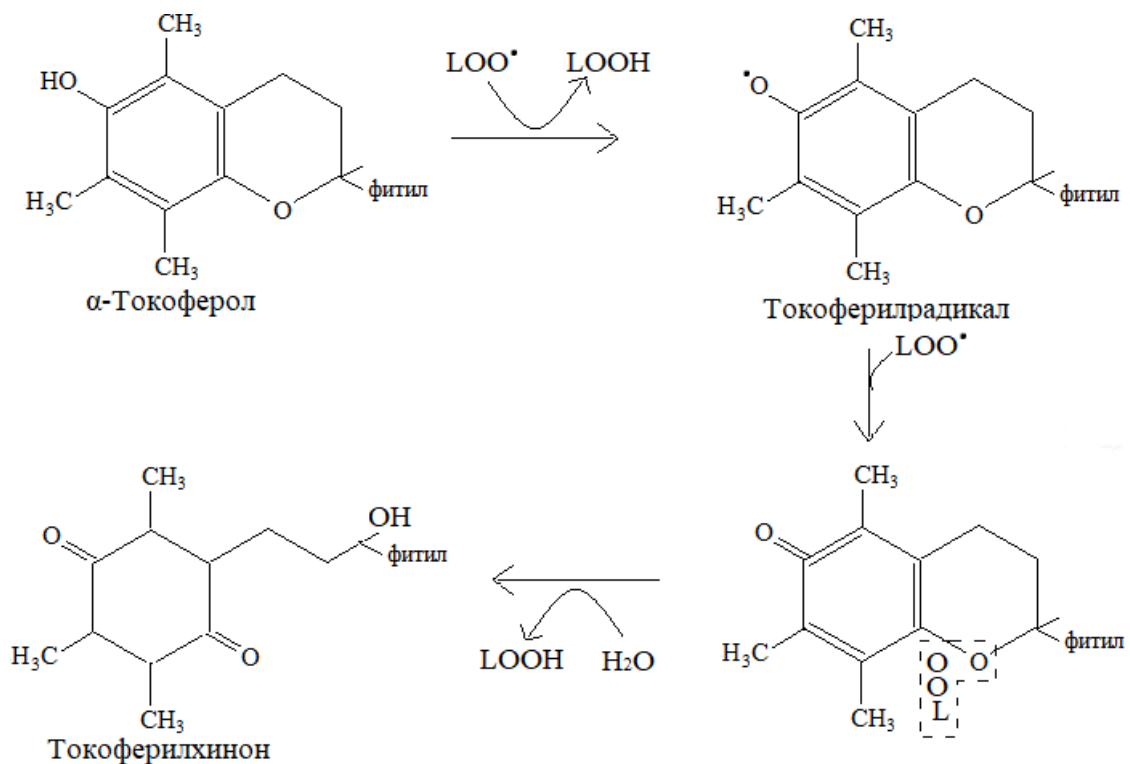


Рисунок 6 – Механизм антиоксидантного действия витамина E

Убихинон (коэнзим-Q10) – жирорастворимое витаминоподобное вещество, участвующее в переносе электронов с комплексов I и II на комплекс III дыхательной цепи. Убихинон постоянно синтезируется в клетках и способен регенерироваться, то есть постоянно восстанавливаться из окисленной формы [11, 12, 94]. Схема образования окисленной и восстановленной форм убихинона представлена на рисунке 7.

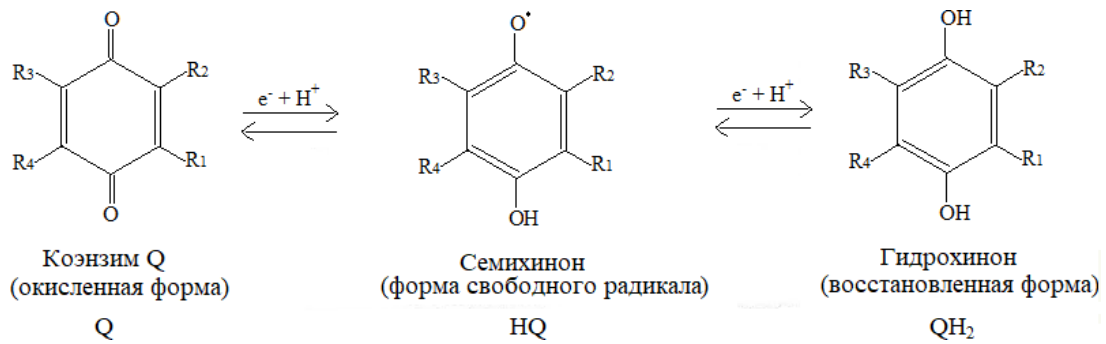


Рисунок 7. Схема превращений коэнзима Q при присоединении к нему электронов [13].

Антиоксидантное свойство убихинона заключается в том, что он способен предупреждать развитие цепных реакций свободнорадикального окисления, в том числе перекисного окисления фосфолипидов клеточных мембран и липопротеинов плазмы [11, 12, 94].

Ретинол (витамин А) участвует в окислительно-восстановительных процессах, а также необходим для защиты биологических мембран от повреждающего действия АФК [11, 12]. На рисунке 8 представлена схема взаимодействия ретинола с  $LOO^\bullet$ . В научной литературе имеются сведения о том, что не только ретинол, но и его предшественник,  $\beta$ -каротин, обладает антиоксидантным действием. При взаимодействии с синглетным кислородом  $\beta$ -каротин окисляется с образованием  $\beta$ -каротин-5,8-эндопероксида.

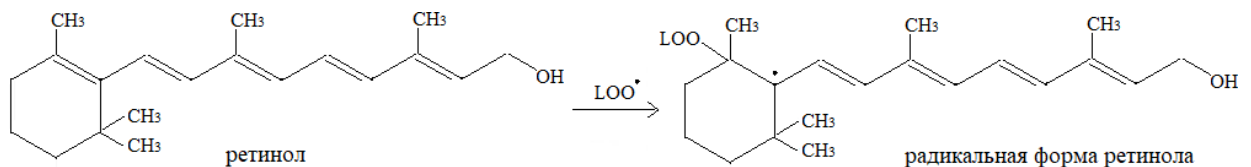


Рисунок 8 – Взаимодействие витамина А с липопероксидным радикалом [186]

Витамин С – важный антиоксидант межклеточной жидкости, связывает и инактивирует  $O_2^{\bullet -}$ ,  $HO^\bullet$  и пероксиды (рисунок 9).

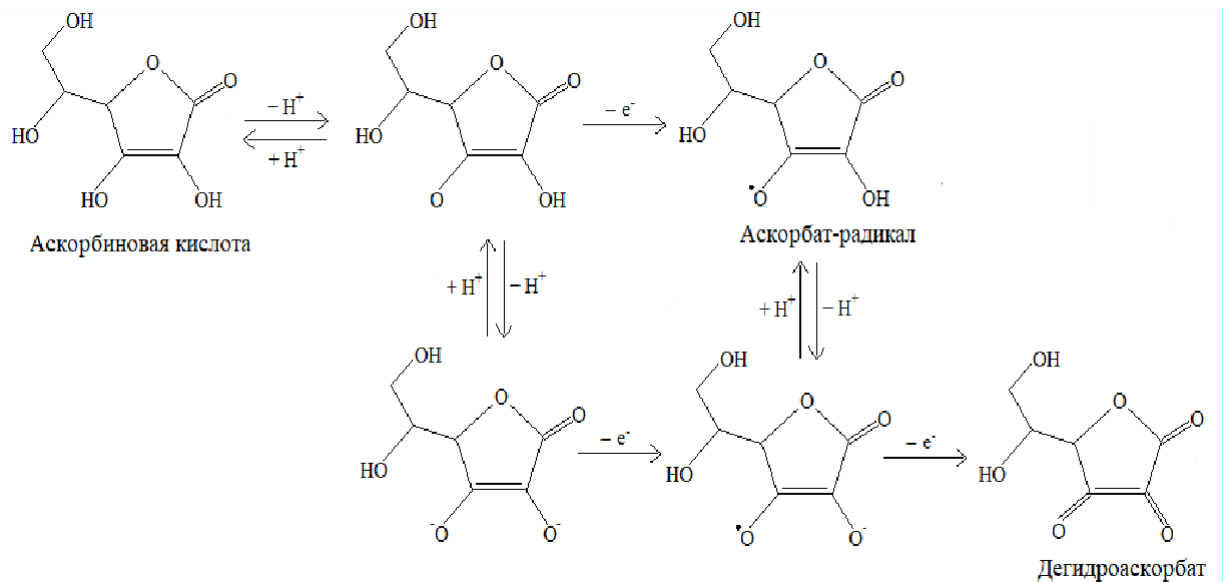


Рисунок 9 – Механизм окисления аскорбиновой кислоты [186]

Он нейтрализует свободные радикалы до того, как последние достигнут мембраны, а также восстанавливает окисленную форму токоферола и поддерживает необходимую концентрацию этого АО в клетках [11, 12].

Глутатион – это трипептид, состоящий из трех аминокислот: глутаминовой кислоты, цистеина и глицина. Присутствие сульфгидрильной группы в глутатионе позволяет ему служить антиоксидантом. Сульфгидрильная группа восстановленного глутатиона (GSH) является донором электронов, при окислении образует дисульфидную связь, соединяющую две молекулы глутатиона, перешедших в окисленную форму (GSSG). Глутатионоксидаза и глутатионпероксидаза катализируют окисление GSH до дисульфида GSH (GSSG) (рисунок 10). Глутатионредуктаза отвечает за регенерацию GSH из GSSG, при этом происходит окисление кофермента НАДФН+Н<sup>+</sup>.

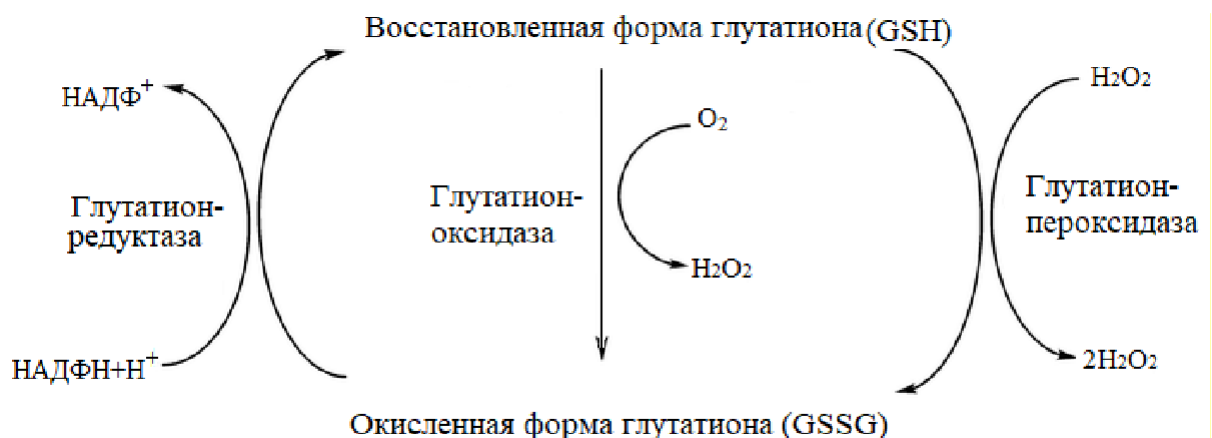


Рисунок 10 – Механизм окислительно-восстановительных превращений глутатиона [186].

Церулоплазмин является белком плазмы крови, одна молекула которого связывает и транспортирует до шести атомов меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Церулоплазмин имеет другое название – феррооксидаза, поскольку способен катализировать окисление ионов двухвалентного железа в трехвалентное. Ионы  $\text{Fe}^{3+}$ , встраиваются в ферритин, что предотвращает их способность, как металлов с переменной валентностью, генерировать прооксиданты, например, гидроксидные радикалы [51, 86].

Для оценки активности АОС используют различные методы исследования – спектрофотометрические, хроматографические, люминесцентные. Биологическим материалом для исследования служат жидкие среды организма (кровь, ликвор), гомогенаты тканей, культуральные жидкости. Лабораторными маркерами оценки оксидативного стресса являются вещества, обладающие оксидантными свойствами (пероксид водорода, нитрозил-радикал), антиоксидантной способностью (СОД, каталаза, церулоплазмин, витаминов E, A, C, глутатион), а также продукты ПОЛ (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты) [1, 56, 151].

### **1.2.3. Роль оксидативного стресса в физиологических процессах и патогенезе заболеваний**

Кислород необходим для жизни всех аэробных организмов, однако при определенных условиях он становится токсичным. В здоровом организме непрерывно образуются АФК как продукты нормального метаболизма кислорода [102, 169]. 95-98% экзогенного кислорода восстанавливается до  $\text{H}_2\text{O}$  в митохондриях в результате окислительного фосфорилирования, при котором образуется АТФ и выделяется теплота. Остальные 2-5% в ходе разнообразных ферментативных и неферментативных реакций превращаются в АФК [51, 102, 200].

С одной стороны, свободнорадикальные процессы обеспечивают нормальную жизнедеятельность здорового организма. Формирование свободных радикалов является важным защитным механизмом, лежащим в основе кислород-зависимого киллинга при фагоцитозе [38, 51]. Под действием мембранной НАДФН-оксидазы молекулы кислорода восстанавливаются с

образованем супероксидного анион-радикала и запускается каскадный процесс генерации АФК. В фагоцитирующих клетках происходит многократное увеличение содержания АФК с одновременным повышением потребления кислорода в двадцать и более раз, так называемый, «дыхательный (кислородный, респираторный) взрыв» [18]. Он является ответной реакцией врожденного клеточного иммунитета и может вызывать необратимые, летальные повреждения молекул и клеток микроорганизмов [15, 20]. При выраженном воспалении, разрушении большого количества фагоцитов АФК попадают в окружающие ткани и инициируют в них протекание свободнорадикальных процессов [38, 51], так защитная реакция организма становится патологической.

Предполагается, что некоторые АФК (пероксид водорода, супероксидный анион-радикал, пероксинитрит) могут функционировать как «классические» вторичные мессенджеры, посредством посттрансляционной модификации белков, содержащих в своем составе редокс-чувствительные остатки цистеина, которые могут подвергаться окислению АФК. При этом результат взаимодействия зависит от типа клеток, места внутриклеточной генерации и вида АФК, дозы и длительности воздействия [38, 95].

С другой стороны, усиление свободнорадикального окисления, является типовым патологическим процессом, компонентом патогенеза многих заболеваний [114, 120, 146].

Оксидативный или окислительный стресс (ОС) является результатом избыточного образования активных форм кислорода (АФК) при недостаточности факторов антиоксидантой защиты, что приводит к повреждению тканей организма в результате образования высокореактивных радикалов, изменяющих структуру белков, липидов и ДНК клеток (рисунок 11) [108, 129, 181]. Действие неблагоприятных производственных факторов, неудовлетворительная экологическая обстановка, облучение, стрессы провоцируют увеличение концентрации АФК в организме [1, 163]. Увеличение АФК и снижение количества антиоксидантов наблюдается при старении организма [89, 107].



Рисунок 11 – Нарушение оксидативного баланса

ОС рассматривается как патогенетический фактор широкого круга патологических состояний и заболеваний человека, таких как атеросклероз, сепсис, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, полиорганная дисфункция, хроническая болезнь почек, сахарный диабет, артериальная гипертензия, гломерулонефрит, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные (болезни Паркинсона, Альцгеймера), онкологические заболевания [95, 128, 148, 174].

Одним из инициирующих событий атеросклеротического процесса является образование модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в результате взаимодействия с АФК. Модифицированные окислением и галогенированием ЛПНП (мЛПНП) обладают повышенным сродством к scavenger-рецепторам (рецепторы-мусорщики) макрофагов, которые активно поглощают мЛПНП, и в результате фагоциты превращаются в «пенистые клетки» – основу формирования атеросклеротических бляшек в стенках сосудов [41, 50].

В настоящее время опубликованы данные об участии свободно-радикальных процессов в патогенезе ряда инфекционных заболеваний [28, 111, 171]. Доказано, что интенсивность ПОЛ зависит от степени выраженности воспалительного процесса, именно поэтому эффективность лечения обусловлена степенью защиты клеточных мембран [110, 137, 179].

Лабораторная медицина в настоящее время располагает тест-системами, позволяющими определять широкий спектр как оксидантов, так и антиоксидантов [123]. Так, лабораторными маркерами антиоксидантной защиты являются: супероксиддисмутаза (Cu/ZnSOD) 1, 2, 3, миелопероксидаза, каталаза, глутатионпероксидаза 1, 2, 3, 4, тиоредоксин, тиоредоксинредуктаза 1, тиоловый статус, общий антиоксидантный статус.

К лабораторным маркерам свободнорадикального окисления относятся: нитрозил-радикал, перексиды, продукты окисления белков, гидропероксиды липидов, окислительно модифицированные ЛПНП, антитела к окисленным ЛПНП, 7,8-дигидро-8- гидроксигуанозин [90].

Таким образом, исследование показателей ОС, развивающегося в результате дисбаланса между содержанием АФК и АО помогает определить патогенез многих патологических процессов и оценить степень риска возникновения различных заболеваний. Устранение ОС повышает эффективность профилактических и лечебно-реабилитационных мероприятий [51, 86, 168]. Система матриксных металлопротеиназ (ММР) – тканевых ингибиторов ММР (ТИМР).

### **1.3. Система матриксных металлопротеиназ (ММР) – тканевых ингибиторов ММР (ТИМР)**

#### **1.3.1 Матриксные металлопротеиназы. ММР-9**

Матриксные металлопротеиназы (ММР) относятся к семейству цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз, которые расщепляют пептидные связи, расположенные внутри полипептидной цепочки [132, 217]. Большинство из них синтезируется как препробелки, а затем секретруется клетками в экстрацеллюлярный матрикс в виде неактивных предшественников – проферментов, активация которых приводит к протеолизу белков межклеточного вещества и базальных мембран [24, 35].

Первая публикация о ММР датируется 1962 годом, когда J. Gross и С. Lapiere сообщили о новом ферменте, обнаруженном ими в период метаморфоза



в хвосте головастика [136]. Позднее была доказана роль ММР в перестройке экстрацеллюлярного матрикса в ходе физиологических и патологических процессов у животных и человека [119, 196]. При этом конституциональные ММР наиболее активны в эмбриогенезе, а после рождения постепенно снижается и остается низкой в течение всей жизни. Однако содержание индуцибельных ММР может изменяться на протяжении жизни в зависимости от характера, стадии патологических процессов, влияния тканевых ингибиторов металлопротеиназ, индукторов, лекарственных средств [21, 198, 218, 219].

В настоящее время идентифицировано 28 типов ММР, классифицированных на 6 различных групп (таблица 4) [25, 72, 81].

ММР отличаются друг от друга особенностями молекулярной структуры, субстратной специфичностью и распределением в тканях, однако все они обладают общими признаками: имеют общие участки аминокислотных последовательностей, синтезируются в виде проферментов, имеют каталитический домен с тремя остатками аминокислоты – гистидина и ионом цинка ( $Zn^{2+}$ ) в активном центре [31, 133]. ММР участвуют в процессах развития и ремоделирования внеклеточного матрикса, в эмбриогенезе, репарации тканей организма и в обмене белков соединительной ткани [55, 116, 150]. ММР также способны изменять активность факторов роста и сигнальных молекул [14].

ММР играют важную роль в ремоделировании различных тканей и органов, т.к. они оказывают влияние на резорбцию, миграцию, адгезию и пролиферацию различных клеток и тканей. Чрезмерная экспрессия ММР отмечается при различных патологических состояниях (фиброзе печени, метастазировании опухолей) и заболеваниях (серечно-сосудистых, бронхиальной астма) [8, 121, 142, 169].

Наиболее изучены коллагеназы (ММР-1, -8, -13, -18) [144, 157, 199, 204] и желатиназы (ММР-2, -9) [158, 159], участвующие в расщеплении коллагенов I, II, III, IV и V типов и других компонентов межклеточного матрикса, включая неколлагеновые белки.

Активность ММР регулируется на нескольких уровнях [128, 160]. Индукторами экспрессии ММР на уровне транскрипции могут быть факторы роста (эндотелия, трансформирующий фактор роста бета) и цитокины (интерлейкины-1, -4, -6, фактор некроза опухоли альфа) [144].

Таблица 4 – Группы матриксных металлопротеиназ [39, 55, 81, 115]

Группа	Ферменты	Субстраты
Коллагеназы	ММР-1, ММР-8, ММР-13	Коллагены I, II, III, VII и X типов, агрекан, фибронектин
Желатиназы	ММР-2 (желатиназа А), ММР-9 (желатиназа Б)	Желатин, коллагены I, IV, V, X, XI и XVI типов, декорин, эластин, фибриллин, ламинин
Стромелизины	ММР-3 (стромелизин-1), ММР-10 (стромелизин-2), ММР-11 (стромелизин-3)	Желатин, протеогликаны, про-ММР-1, фибронектин, эластин, ламинин, коллагены, $\alpha$ 1-атнитрипсин, казеин
Матрилизины	ММР-7 (матрилизин-1), ММР-26 (матрилизин-2)	Желатин, фибронектин, эластин, про-ММР-1
Матриксные металлопротеиназы мембранного типа	МТ-1-ММР, МТ-2-ММР, МТ-3-ММР, МТ-4-ММР, МТ-5-ММР, МТ-6-ММР (или ММР-14, -15, -16, -17, -24, -25 соотв.)	Про-ММР-2, коллаген III типа, фибронектин, ламинин, агрекан, желатин, энтактин
Неклассифицированные матриксные металлопротеиназы	ММР-12	Эластин, коллаген IV типа, $\alpha$ 1-антитрипсин, казеин, фибронектин, желатин, протеогликаны, фибриноген, фибрин, плазминоген
	ММР-18, ММР-19	Коллаген IV типа, ламинин, фибронектин, витронектин, агрекан, нидоген
	ММР-20	Амелогенин
	ММР-21, ММР-22, ММР-23а, ММР-23b, ММР-27	В настоящий момент не изучены
	ММР-28	Белки нервной ткани

На постраскрипционном уровне активация ММР осуществляется протеазами (плазмин, урокиназа, тканевый активатор плазминогена, катепсин-9, хемотрипсиноподобные ферменты и др.) и некоторыми другими ММР путем частичного протеолиза [152, 172, 177].

В физиологических условиях во взрослых организмах ММР присутствует в тканях в незначительных количествах [2, 24, 177]. Инактивация избыточного количества ММР обеспечивается специфическими тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP) [213], белками плазмы крови (альфа-2-макроглобулин), селективным эндоцитозом. Для ММР-2 и ММР-9 был выявлен путь эндоцитоза – посредством рецепторов липопротеинов низкой плотности [222].

Желатиназы (А и В) – ММР-2 и ММР-9 имеют сходное строение и субстраты [8, 31, 39]. Желатиназы имеют три последовательности по 58 аминокислотных остатков, которые составляют фибронектиновый домен, обеспечивающий взаимодействие ферментов с желатинами, коллагенами, ламинином, фибронектином и другими субстратами. Этот участок располагается рядом с цинк-связывающим мотивом каталитического домена [147].

ММР-9 продуцируется многими клетками (фибробластами, макрофагами, нейтрофилами, одонтобластами) и проявляет ферментативную активность в межклеточном веществе соединительной ткани [101, 124, 175, 192]. Профермент имеет молекулярную массу, равную 92 кДа, активный фермент – 68-82 кДа [103, 206, 220]. Основной функцией ММР-9 является протеолиз белков экстрацеллюлярного матрикса. Этот фермент расщепляет желатин, коллагены IV, V, XI и XVI типов, декорин, эластин, фибриллин, ламинин, а также активирует различные факторы роста (pro-TGF- $\beta$ ) и воспаления (pro-TNF- $\alpha$ ). ММР-9 участвует во всех фазах репарации ран – воспаления, пролиферации грануляционной ткани и ангиогенеза, реэпителизации, тканевого ремоделирования. Ферментативная активность ММР-9 проявляется в протеолизе белков экстрацеллюлярного матрикса (желатин, эластин, фибриллин, аггрекан, коллагены I, III, IV, VII типов), который на этапах регенерации имеет различное

значение: в фазу воспаления – очищение раневых дефектов, пролиферации – ремоделирование грануляционной ткани, эпителизации – стимуляция подвижности кератиноцитов, способствующая реэпителизации [205].

### **1.3.2. Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ. TIMP-1**

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (TIMP) – это семейство ферментов, содержащихся в соединительной ткани и специфически ингибирующих протеолитическую активность матричных металлопротеиназ на посттранскрипционном уровне [211, 212, 214]. TIMP – низкомолекулярные (20-28 кДа) белки, которые синтезируются фибробластами и лейкоцитами и секретируются в экстрацеллюлярный матрикс [31, 39, 167]. TIMP обратимо блокируют активность MMP в эквимольном соотношении, образуя с ними прочные комплексные соединения [125, 188, 194]. TIMP могут образовывать комплексы, соединяясь с цинк-связывающими участками не только с активных форм MMP, но и с их предшественниками – проферментами [39, 98, 173].

В организме млекопитающих обнаружено 4 типа TIMP: TIMP-1, TIMP- 2, TIMP-3, TIMP-4. Из них TIMP-1, TIMP-2 и TIMP-4 секретируются в растворимой форме, TIMP-3 – связан с внеклеточным матриксом [43, 112, 161, 181]. В составе TIMP присутствуют два домена, стабилизированных шестью дисульфидными связями. Один из них необходим для ингибирования, а другой способен связываться с субстратами [162]. Отличаются TIMP друг от друга своей специфичностью и активностью. Так, TIMP-2 наиболее активно ингибирует MMP-2, а TIMP-1 преимущественно связывается с MMP-9 [37, 153].

TIMP-1 – белок с молекулярной массой 28кДа, образуется во многих тканях [209, 210]. Транскрипция TIMP, так же, как и MMP, регулируется цитокинами и факторами роста [154]. Механизм действия ингибитора на сегодняшний день изучен недостаточно [118, 130]. Имеются данные о том, что TIMP-1 способен ингибировать ангиогенез, рост опухолей и метастазирование [207]. Известно, что TIMP-1 избирательно ингибирует MMP-9 [153, 182] и является модулятором роста эндотелиальных клеток капилляров [43, 98].

## **1.4. Современные представления о раневом процессе и механизмах регенерации тканей**

### **1.4.1. Классификация ожогов по степени поражения тканей**

Согласно единой классификации термических ожогов по А.А. Вишневскому (предложена А.А. Вишневским, Г.Д. Вилявиным и М.И. Шрайбером на XXXVII Всесоюзном съезде хирургов в 1960 г.) выделяют четыре их степени в зависимости от глубины поражения тканей кожи [44, 58, 87]:

– ожоги I степени характеризуются поражением поверхностного слоя эпидермиса, покраснением кожи, припухлостью, гиперемией, альтерацией, экссудацией и отеком, которые исчезают в течение 3-4 дней;

– ожоги II степени отличаются образованием пузырей сразу после ожога или в течение суток, отслаиванием ороговевшего эпидермиса, полное заживление наступает через 10-15 дней;

– ожоги IIIA степени квалифицируются повреждением более глубоких слоев эпидермиса с частичным сохранением росткового слоя, сальных, потовых желез, волосяных луковиц. Происходит образование струпа, иногда перемежающегося с участками пузырей. Самостоятельное заживление ран возможно за счет роста эпителия из волосяных луковиц, сальных и потовых желез в течение 3-6 недель;

– ожоги IIIB степени определяются полным омертвением всех слоев кожи с образованием плотного струпа темно-коричневого цвета. После самостоятельного отторжения струпа (от 2-х до 4-6 недель) обнажается гранулирующая поверхность, неспособная к самостоятельной эпителизации, медленно заживающая путем рубцевания;

– ожоги IV степени приводят к некрозу не только кожи, но и подлежащих тканей (сухожилий, мышц, костей), внутренних органов, вплоть до обугливания отдельных частей тела. Плотный струп распространяется на большую глубину и отторгается очень медленно (от 4 до 8 недель).

В современной практической медицине глубина ожогового поражения определяется на основе международной классификации болезней и связанных с

ними проблем здоровья 10-го пересмотра (МКБ-10, Москва, 1993), согласно которой выделяют следующие степени термических и химических ожогов [49, 87] (таблица 5):

- I степень соответствует I степени ожога по классификации А.А. Вишневского;
- II степень – поверхностный ожог с поражением эпидермального слоя и верхнего слоя дермы, что соответствует II и IIIA степени по классификации А.А. Вишневского;
- III степень – некроз дермы вплоть до собственной фасции и, в ряде случаев, с повреждением мягких тканей, костей, внутренних органов, что соответствует IIIB и IV степени по классификации А.А. Вишневского. Только небольшие глубокие ожоги заживают за счет контракции раны и краевой эпителизации. Во всех остальных случаях самостоятельное заживление невозможно, и возникает необходимость в проведении различных видов кожной пластики.

Таблица 5 – Соотношение классификации степеней ожога по МКБ-10 с классификацией XXVII съезда хирургов СССР (А.А. Вишневский, 1960 г.) и глубиной поражения [87]

Характеристика	Классификация А.А. Вишневского	Классификация по МКБ-10	Глубина ожога
Гиперемия кожи	I степень	I степень	Поверхностный ожог
Образование пузырей	II степень	II степень	
Некроз кожи	III A степень		
Полный некроз кожи	III B степень	III степень	Глубокий ожог
Некроз кожи и подлежащих тканей	IV степень		

#### 1.4.2. Фазы раневого процесса

Раневой процесс – это сложный комплекс местных и общих биохимических реакций тканей и систем организма, направленных на борьбу с инфекцией, отграничение и отторжение некротизированных масс, а также на

восстановление и замещение поврежденных структур [42, 80].

Отличительной особенностью ожоговых ран, по сравнению с другими травмами, является более длительное их заживление, так как регенерация кожных дефектов происходит от участков частично поврежденной ткани [87, 96].

В патогенезе развивающихся местных нарушений участвуют многочисленные биологически активные вещества: АФК; продукты ПОЛ; медиаторы воспаления; продукты распада белков, липидов и углеводов; ферменты; факторы свертывания и др. В результате сочетанного действия биологически активных веществ повышается проницаемость сосудов, нарушается микроциркуляция, развивается ацидоз [58]. Патофизиологи характеризуют воспаление как типовой патологический процесс и выделяют в нем три последовательные стадии: альтерация, эксудация и пролиферация (рисунок 12) [80].

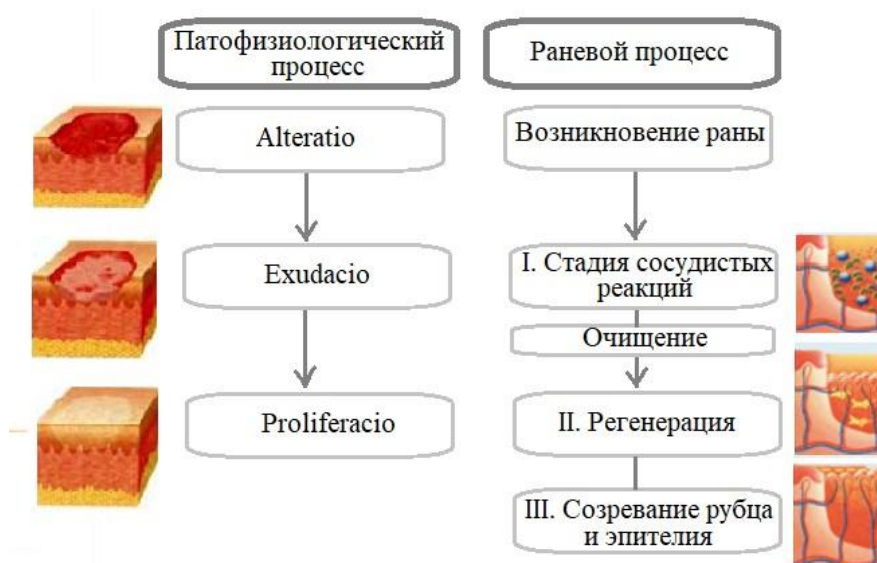


Рис. 12 – Взаимоотношение стадий патофизиологического и раневого процессов [80]

### 1.4.3. Заживление термических ожогов:

#### локальные морфологические и биохимические изменения

Процесс восстановления после термической травмы кожи осуществляется каскадно и подразумевает последовательную смену стадий, характеризующихся

развитием функциональных и морфологических изменений в самой ране и окружающих тканях. Упомянутые выше (таблица 5) классификации раневого процесса отражают его фазность: воспаление, пролиферацию и эпителизацию с реорганизацией рубца [4, 23]. При сохранении стереотипности морфологических событий на длительность течения каждой фазы оказывают влияние происхождение повреждающего фактора, степень повреждения и его локализация, наличие инфекции, возраст и состояние организма. Вне зависимости от условий, сопровождающих заживление кожных дефектов, ключевая роль в нем принадлежит клеточным элементам, обеспечивающим закономерную смену стадий: воспаление (медиаторная и микроциркуляторная реакция, экссудация и миграция клеток из сосудов, очищение от продуктов распада), пролиферация фибробластов и рост сосудов, фибриллогенез коллагена, созревание и фиброзное превращение грануляционной ткани, рост эпителия и реорганизация рубца [93].

В фазу воспаления в момент повреждения в рану вместе с кровью проникают клеточные элементы и различные белки. В течение пятидесяти минут начинается интенсивная вазоконстрикция [44, 82, 83]. Изменения, вызванные прямым действием термического фактора, относятся к первичной альтерации, при которой в очаге воспаления развивается тканевая гипоксия и метаболический ацидоз, а также гиперииония и гиперосмия. Серотонин выделяется тромбоцитами сразу после ожоговой травмы и в малых концентрациях участвует в расширении артериол. Гипоксия и продукты первичной альтерации инициируют вторичную альтерацию, при которой интенсивно происходит ПОЛ и высвобождаются лизосомальные ферменты нейтрофилов и макрофагов. Клеточные мембраны и компоненты опорной ткани подвергаются действию фосфолипазы, коллагеназы, эластазы, экзогликозидазы. Опосредованно повреждение клеточных мембран происходит за счет действия компонентов контактной полисистемы белков плазмы крови (системы комплемента, каликреин-кининовой системы, фагоцитоза, системы свертывания крови), а также действия биогенных аминов [58]. Гистамин повышает адгезивные свойства эндотелия сосудов, способствует эмиграции лейкоцитов,



стимулирует фагоцитоз. Спустя 20 минут при взаимодействии с гистамином начинается вазодилатация [74]. В ходе вторичной альтерации полиморфноядерные лейкоциты выделяют фактор активации тромбоцитов, активирующий агрегацию, хемотаксис и связывание нейтрофилов с эндотелиоцитами, продуцирующими интерлейкин-1. Фактор активации тромбоцитов усиливает экссудацию плазмы, миграцию лейкоцитов и высвобождение лизосомальных ферментов полиморфноядерных лейкоцитов, а также стимулирует образование АФК [58]. Вследствие миграции лейкоцитов к поверхности раны образуется лейкоцитарная пробка [74]. Полиморфноядерные лейкоциты также продуцируют нейтральные протеазы, участвующие в деструкции волокон базальной мембраны сосудов и кислые протеазы, проявляющие свою активность в условиях ацидоза [58].

Медиаторы воспаления, образующиеся при альтерации, приводят к экссудации [80], включающей ряд последовательных сосудистых реакций (ишемию, артериальную гиперемию, венозную гиперемию и стаз), процесс формирования отека, миграцию лейкоцитов, хемотаксис и фагоцитоз. К внутрисосудистым изменениям, происходящим при экссудации, можно отнести: нарушения в системе свертывания крови и фибринолиза; сгущение крови, стаз; адгезию и агрегацию тромбоцитов; агрегацию эритроцитов. К внесосудистым изменениям – механическое препятствие оттока крови экссудатом; фибриновые тромбы в лимфатических капиллярах; периваскулярный отек и инфильтрацию; повышение тонуса вен под влиянием биологически активных веществ и др. Основным механизмом экссудации является повышение проницаемости сосудистой стенки. Процесс альтерации является кратковременным и продолжается в среднем до 30 мин, экссудация происходит после латентного периода разной длительности от 1 до 8 часов [58]. Примерно через 24-48 часов в ране появляются мононуклеарные фагоциты, а также макрофаги, которые способствуют высвобождению факторов гемостаза и факторов роста, активирующих рост кровеносных сосудов [74]. В течение периода от 1 до 7 суток повышение проницаемости опосредуется действием полипептидных и липидных медиаторов на капилляры [58]. На 4 сутки в ране

доминируют долгоживущие макрофаги, необходимые для очищения раны от некротических тканей и инородных тел. Примерно на 5 сутки в рану поступают фибробласты и эндотелиальные клетки [74].

На следующей стадии репаративного процесса – пролиферации – ареал раневого дефекта под струпом постепенно уменьшается по площади. Пролiferация соединительной ткани продолжается в течение трех недель после нанесения травмы. Благодаря фибробластам образуются различные белки, необходимые для заживления раны (коллаген, гликозаминогликаны, эластин). Также фибробласты содержат ферменты, играющие важную роль в таких процессах, как синтез холестерина, цикл лимонной кислоты и гликолиз. В течение 7-14 дней после травмы незрелые коллагеновые фибриллы гистологически заметны, образуется грануляционная ткань, имеющая розовый оттенок из-за активного ангиогенеза и кровенаполнения капилляров [74, 80]. В соответствии с классификацией Н.Н. Аничкова и соавт. (1951), в грануляционной ткани можно выделить: верхний слой (лейкоцитарно-некротический), средний слой (капиллярные петли грануляций) и глубокий слой (вертикальнорасположенные капилляры). В более поздние сроки (от 2 до 4 недель) образуется слой горизонтально расположенных фибробластов [58].

В фазу ремодуляции происходит преобразование грануляционной ткани в соединительную с образованием рубца, который приобретает свой внешний вид и гистологическую структуру, функции и прочность в результате замещения коллагена третьего типа, синтезированного в первые недели заживления, стабильным коллагеном первого типа [73]. К концу фазы увеличивается плотность коллагеновых пучков и их пространственная ориентация параллельно поверхности кожи. Соединительная ткань обедняется клетками, так как макрофаги и фибробласты редуцируются через апоптоз.

Регенерирующий эпителий постепенно нарастает под струпом с краев раны по новообразованной соединительной ткани в результате мобилизации клеток базального слоя эпидермиса, их миграции из прилежащих областей, пролиферации и дифференцировки [74, 80]. Таким образом, заживление кожной травмы заканчивается в течение 1-8 недель в зависимости от степени ожога, его

площади и локализации. В научной литературе дискутируется возможность образования специфических производных кожи в результате завершения заживления полнослойных повреждений кожи. Так, в монографии Е.А. Ефимова [30], констатируется, что в ходе спонтанного заживления формируется рубец, который практически не может перестроиться в нормальную кожу. Однако, как показали последние исследования [96], в условиях стимуляции возможно образование полноценного тканеспецифичного регенерата, содержащего все дериваты кожи.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Дизайн исследования

Настоящая научная работа является экспериментальным, рандомизированным и контролируемым исследованием.

На рисунке 13 представлена схема эксперимента по оценке прорегенераторных свойств нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ) в виде 2% мази на модели термических ожогов кожи крыс, включающая обследованные группы животных, виды биоматериала, методы биохимических исследований.

#### 2.2. Эксперимент по оценке прорегенераторных свойств нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на модели термических ожогов кожи крыс

##### 2.2.1. Объект исследования и условия содержания эксперимен- тальных животных

Модельными объектами исследования выступили белые неинbredные половозрелые крысы, подбор которых осуществлялся по принципу аналогии исходной массы тела (180-200 г), пола (самки) и возраста (2-3 мес.). Перед постановкой эксперимента животных выдерживали в карантине в течение 14 суток на стандартном пищевом и водном рационах при естественном освещении и температуре воздуха в интервале 18-22°C, в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». По окончании карантина проводили общую оценку физиологического состояния крыс по виду слизистых оболочек, уровню двигательной активности и потреблению корма и воды.



Рисунок 13 – Дизайн эксперимента по оценке прорегенераторных свойств нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на модели термических ожогов кожи крыс

Ко времени проведения исследования все животные были здоровыми, без изменений аппетита, поведения, режима сна и бодрствования.

### **2.2.2. Характеристика групп экспериментальных животных**

Исследование проведено на 85 крысах. Экспериментальный термический ожог кожи наносили 75 крысам. Животных после моделирования экспериментального ожога рандомизировали на четыре группы.

Три группы животных – опытная, контрольная 1, контрольная 2 отличались по воздействию на область дефекта. У 20 крыс контрольной группы 1 наблюдалось спонтанное течение раневого процесса, местных аппликаций не проводили. Ежедневно, до полного заживления ран, 20 животным контрольной группы 2 на область поражения наносили мазевую основу (полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, вода, в количествах согласно прописи мази), 20 крысам опытной группы – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ) в виде 2% мази в количестве 2 г.

15 животным четвертой группы с нанесенными экспериментальными ожогами проводили однократную аппликацию 2% мази 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в количестве 2 г и через 2 часа получали образцы венозной крови, которые использовали для определения резорбции действующего вещества мази в системный кровоток методом ВЭЖХ-масс-спектрометрического исследования.

У 10 интактных крыс, находившихся в условиях содержания, аналогичных животным, включенным в эксперимент, но без каких-либо вмешательств, в 1 сутки эксперимента получали кровь для определения базовых (нормальных) концентраций изучаемых биохимических показателей.

Животных относили к группам с использованием способа рандомизации – таблицы случайных чисел.

Формировать группу животных с воздействием на область ожога мази, содержащей ацексамовую кислоту, сочли нецелесообразным, принимая во внимание исследования [17, 65, 117], в которых установлен ограниченный по выраженности стимулирующий эффект на восстановление аналогичного дефекта кожи.

### **2.2.3. Методика формирования термического ожога кожи у крыс**

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Руководства по работе с лабораторными животными при проведении доклинических испытаний (ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва, 2015), ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (22.09.2010). На работу получено положительное решение локального Этического комитета ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 30 сентября 2020 года) в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинской декларации.

Накануне эксперимента проводили подготовку операционного поля: на дорзальной поверхности тела в межлопаточной области у животных выстригали ножницами волосяной покров, а затем с помощью крема-депилятора удаляли его остатки, добиваясь абсолютного отсутствия шерсти. На следующий день всем животным однотипно наносили экспериментальные полнослойные термические дефекты кожи в межлопаточной области площадью 225 мм<sup>2</sup> в условиях анестезии («Золетил-100» в дозе 20 мг/кг внутримышечно) [71] контактно с помощью стального трафарета (температура накаливания 240°C, экспозиция 8 сек), в результате в месте воздействия получали термический ожог III Б степени.

### **2.2.4. Методика приготовления мази с новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и режим обработки ожоговых ран**

В отделе химии и технологии синтетических лекарственных средств АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна; руководитель – лауреат Государственной премии РФ, д.х.н., профессор С.Я. Скачилова) был синтезирован 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (рисунок 14)

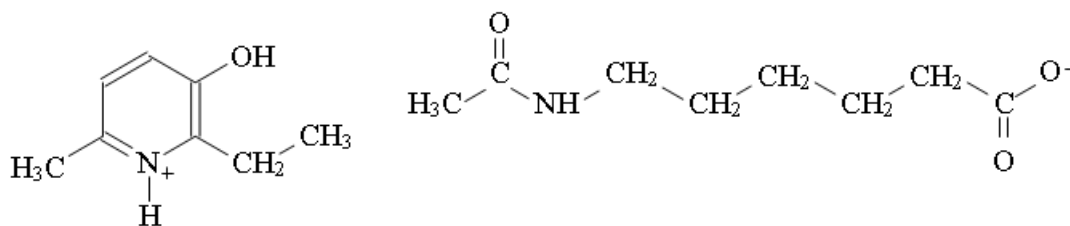


Рисунок 14 – Химическая структура 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата [62].

Исследуемое соединение 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ было использовано в виде активной фармацевтической субстанции для изготовления 2% гомогенной мази на основе полиэтиленгликоля для аппликаций на экспериментальные ожоговые раны кожи крыс.

Мазь готовили согласно прописи на 100 г:

2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата – 2,0 г

Поливиниловый спирт – 10,0 г

Полиэтиленгликоль (ПЭГ 400) – 5,0 г

Вода – 83,0 г.

В работе использовали 2% мазь, так как эта концентрация 2-Э-6-М-3-ГП была максимальной для получения гомогенной мази. Для местного лечения ран использовали гомогенную мазь, в которой действующее вещество находится в растворенном состоянии, так как гетерогенные мази могут обладать травмирующим действием на ткани за счет содержащихся в них твердых частиц.

Местные аппликации веществ крысам опытной и контрольной 2 групп проводили ежедневно однократно в количестве 2 г после измерения площади ожоговых ран, начиная с первых суток эксперимента до отторжения струпа.

Таким образом, при однократной аппликации на раны наносилось 40мг 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, что с учетом массы крыс 180-200 г, составляет 200-222 мкг/кг. Принимая во внимание данные М. А. Миронова и Е. В. Блиновой (2018) о показателях острой токсичности N-A-6-АГ кислоты и ее производных, LD50 для которых была в пределах 1234-2558 мг/кг, можно



считать нетоксичной применяемую в настоящем исследовании однократную дозу действующего вещества [48].

С крысами контрольной 1 группы после измерения площади ран проводили манипуляции, имитирующие нанесение аппликаций.

Кроме того, в настоящем исследовании был поставлен эксперимент с применением метода ВЭЖХ-масс-спектрометрии для изучения резорбции 2- Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в системный кровоток из мази при ее аппликации на ожоговые раны крыс, который продемонстрировал незначительную степень резорбции исследуемого вещества через поверхность ожогового дефекта.

### **2.2.5. Планиметрическая оценка процесса репарации ожоговых ран у крыс**

Оценку динамики заживления ожогового дефекта осуществляли планиметрическим методом. Начиная со вторых суток после нанесения повреждения, ежедневно на прозрачную плёнку переносили контуры каждого дефекта, затем подсчитывали его площадь с помощью миллиметровой бумаги. Абсолютную площадь ( $S$ , мм<sup>2</sup>) поверхностного дефекта кожи рассчитывали по формуле 1 [63] с изменениями:

$$S = n + \frac{1}{2} k, \quad (1)$$

где  $n$  – количество квадратов размером  $1 \times 1$  мм, полностью находящихся в пределах контура раны;  $k$  – количество квадратов размером  $1 \times 1$  мм, частично находящихся в пределах контура раны.

Относительное уменьшение площади раны  $\Delta S$  за сутки, характеризующее скорость заживления ожоговых дефектов, вычисляли по формуле 2:

$$\Delta S = (S_{\text{исх}} - S_1) / S_{\text{исх}} \times 100\%, \quad (2)$$

где  $S_{\text{исх}}$  – исходная площадь ожога ( $225 \text{ мм}^2$ ),  $S_1$  – площадь раны на текущий день измерения.

### **2.2.6. Получение биологического материала для биохимических исследований**

Для определения биохимических показателей у животных получали кровь из хвостовой вены [61] в объеме одного миллилитра в вакуумные пробирки с активатором свертывания для получения сыворотки «Vacuette» (Greiner Bio-one, Австрия). У 60 крыс (контрольных 1 и 2, опытной групп) получение крови проводили на 7, 14 и 21 сутки в каждый временной срок исследования от 5 животных. По 5 крыс из каждой группы были оставлены для визуального наблюдения с целью определения полного заживления ожогов. У 10 интактных крыс кровь для биохимических исследований получали однократно на 21 сутки наблюдения. Для получения плазмы крови, необходимой для проведения ВЭЖХ-масс-спектрометрии, забирали кровь из хвостовой вены в объеме 1 мл в вакуумные пробирки «Vacuette» (Greiner Bio-one, Австрия) с  $K_2$ ЭДТА (калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) у 15 крыс через 2 часа после однократной аппликации мази на ожоговые поверхности.

Из жизнеспособных тканей периферии раневых дефектов хирургическими ножницами получали стандартные биоптаты регенерирующих тканей. Масса биоптатов после удаления струпа и подкожной жировой клетчатки с помощью хирургических инструментов в среднем составила  $199,3 \pm 8,7$  мг. Биоптаты помещали в пластиковые микропробирки типа Эппендорф (ROLL s.a.s., Италия) с 1,8 мл изотонического раствора натрия хлорида. После получения биоптатов животных выводили из эксперимента в соответствии с Приказом № 742 от 13.11.84 «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

### **2.3. Методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии для оценки резорбции нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при местных аппликациях мази с этим веществом на ожоговые раны кожи крыс**

Важной характеристикой лекарственных средств для местного применения является их биохимическая активность непосредственно в месте нанесения при отсутствии резорбции (либо низком уровне резорбции) в

системный кровоток. Для оценки резорбции нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при местных аппликациях мази с этим веществом ожоговых ран кожи крыс была применена собственная методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ) в плазме крови крыс [70].

Хроматографическое определение 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ проводили с помощью ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия) и тандемного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex 3200MD QTrap с электрораспылительным источником ионов (Sciex, Сингапур) [69].

Оптимизацию параметров масс-спектрометрического детектирования 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата осуществляли путем введения в источник ионов стандартного раствора вещества (40 нг/мл) с помощью шприцевого инжектора со скоростью 10 мкл/мин. В качестве растворителя использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в абсолютном ацетонитриле. Определяли  $m/z$  ионов предшественников и ионов-продуктов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамовой кислоты и сульфацетамида (внутренний стандарт), полученные данные использовали для дальнейшего построения хроматограмм в режиме мониторинга множественных реакций.

Разделение аналитов проводили с использованием хроматографической колонки Phenomenex Synerdgi C18 4 мкм, 2×50 мм. Элюирование осуществляли смесью деионизированной воды и абсолютного метанола с добавлением 0,1% муравьиной кислоты в градиентном режиме (таблица 7).

Образцы плазмы крови получали путем центрифугирования вакуумных пробирок с кровью с помощью центрифуги «Centrifuge 5804» (Eppendorf AG, Германия) при 1300g в течение 10 минут. Пробоподготовка 15 образцов плазмы крови представляла собой осаждение белков плазмы с помощью абсолютного метанола. Для этого в пробирку типа Эппендорф (ROLL s.a.s., Италия) объемом 2 мл с помощью автоматического микродозатора помещали 200 мкл плазмы крови крыс, добавляли 500 мкл метанольного раствора

сульфацетамида (внутренний стандарт) в концентрации 200 нг/мл, охлажденного до  $-20^{\circ}\text{C}$ , встряхивали на вортексе в течение 15 секунд, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 38000 g и температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант в объеме 200 мкл переносили в одноразовые полиэтиленовые вставки в хроматографических виалах, которые помещали в автоматический пробоотборник хроматографа.

Для приготовления калибровочных и контрольных образцов использовали пулированную плазму пяти интактных крыс. Исходный раствор 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата был приготовлен на деионизированной воде в концентрации 2000 мкг/мл и использовался для приготовления рабочих водных растворов аналита с концентрацией 5, 10, 50, 100, 500, 1000 и 5000 нг/мл.

Таблица 7 – Хроматографические параметры определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата

Хроматографическая колонка	Phenomenex Synerdgi C18 4 мкм, 2×50 мм			
Подвижная фаза А	Деионизированная вода + 0,1% НСООН			
Подвижная фаза В	Абсолютный метанол + 0,1% НСООН			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	% В
	0,0	0,3	90	10
	1,0		90	10
	3,0		10	90
	4,0		10	90
	4,01		90	10
	5,0		90	10
Температура колонки, °С	40			
Объем ввода, мкл	10			
Общее время анализа, мин	5			
Промывка инжектора	3 секунды, 50% раствор изопропилового спирта			

Калибровочные стандарты были получены путем добавления 50 мкл соответствующего рабочего раствора 2-этил-6-метил-3- гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата к 1 мл плазмы крови до достижения концентраций: 0,25; 0,5; 2,5; 5; 25; 50 и 250 нг/мл. Образцы контроля качества были приготовлены аналогично в концентрации 1, 100 и 200 нг/мл. Кроме этого, были приготовлены холостые образцы, не содержащие анализируемое вещество, и внутренний стандарт.

Серия образцов была проанализирована пятикратно, после чего была установлена зависимость сигналов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацетсамовой кислоты, нормированных на сигнал сульфацетамида, от концентрации. Для полученных калибровочных кривых определяли аналитический диапазон, предел детектирования, нижний предел количественного определения, линейность. Обработка результатов была выполнена с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 365.

## **2.4. Биохимические исследования**

### **2.4.1. Методики получения сыворотки крови и приготовления гомогенатов тканей из области раневых дефектов**

Вакуумные пробирки с кровью центрифугировали с помощью центрифуги «Centrifuge 5804» (Eppendorf AG, Германия) при 1300g в течение 10 минут, отбирали образцы сыворотки крови в пластиковые микропробирки типа Эппендорф (ROLL s.a.s., Италия) и хранили при температуре 4°C до выполнения биохимических тестов.

Содержимое микропробирок типа Эппендорф (биоптаты и изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1 : 9 (масса : объем)) переносили в пробирки с шариками для гомогенизации мягких тканей «PrecellysLysing Kit CK14» (Bertin Instruments, Франция) и гомогенизировали в гомогенизаторе «Minilys» (Bertin Technologies, Франция). Затем пробирки центрифугировали при тех же параметрах, отбирали супернатанты в

пластиковые микропробирки типа Эппендорф и хранили при температуре 4°C до выполнения биохимических тестов.

Все биохимические тесты проводили в день получения биоматериалов, сразу же после процедуры получения сыворотки крови и супернатантов гомогенатов тканей.

#### **2.4.2. Методика определения общего количества метаболитов с оксидативными свойствами**

Определение общего окислительного статуса (TOS) в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов выполняли фотометрическим методом по методике O. Erel (2005) [127], используя тест-систему «Total Oxidative status/capacity Perox (TOS) Kit» производства «Immundiagnostik AG» (Германия) [2-5]. Реакции проводили в пластиковом микропланшете, имеющим лунки с плоским дном.

Принцип метода основан на взаимодействии веществ, имеющих прооксидантные свойства, в исследуемых образцах в присутствии пероксидазы хрена и хромогенного субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) с образованием продуктов реакции, окрашенных в голубой цвет. При этом интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию веществ, имеющих прооксидантные свойства. После внесения стоп-раствора (серная кислота), содержимое лунок микропланшета окрашивалось в желтый цвет. Оптическую плотность образцов (контрольных, стандартных и опытных) измеряли при длине волны 450 нм с помощью автоматического микропланшетного анализатора «Infinite F50», производства «TECAN» (Австрия).

В опытные лунки микропланшета вносили по 10 мкл образцов и по 100 мкл раствора А (фосфатно-цитратный буфер), затем фотометрировали при длине волны 450 нм. Далее во все лунки добавляли по 100 мкл смеси, состоящей из 5 мл раствора А, 100 мкл раствора В, содержащего ТМБ, и 5 мкл раствора пероксидазы хрена. Инкубировали микропланшет при 37°C 15

минут, а затем добавляли по 50 мкл стоп-раствора (2 н. раствор серной кислоты) и измеряли оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм. Разность между вторым и первым измерениями прямо пропорциональна содержанию перекисей в образце.

Для расчетов использовали холостую и калибровочную пробы, с концентрацией пероксидных продуктов 340 мкмоль/л. Для контроля точности выполнения работы применяли два контрольных раствора с концентрациями перекисных продуктов 185-308 и 385-641 мкмоль/л.

Параллельно с исследованием опытных образцов проводили реакции для холостой, калибровочной и контрольных проб аналогично методике, описанной выше, однако на первом этапе использовали по 10 мкл изотонического раствора хлорида натрия, калибровочного и контрольных растворов соответственно.

Расчет концентраций пероксидных продуктов в образцах и контролях проводили по формуле (3):

$$C_{\text{оп}} = C_{\text{к}} \times (\Delta\text{ОП}_{\text{оп}} - \Delta\text{ОП}_{\text{хп}}) / (\Delta\text{ОП}_{\text{к}} - \Delta\text{ОП}_{\text{хп}}) \quad (3),$$

где:  $C_{\text{оп}}$  – концентрация пероксидных продуктов в опытной пробе,  $C_{\text{к}}$  – концентрация пероксидных продуктов в калибровочной пробе,  $\Delta\text{ОП}_{\text{оп}}$  – разность между вторым и первым значениями оптической плотности опытной пробы,  $\Delta\text{ОП}_{\text{хп}}$  – разность между вторым и первым значениями оптической плотности холостой пробы,  $\Delta\text{ОП}_{\text{к}}$  – разность между вторым и первым значениями оптической плотности калибровочной пробы,  $\Delta\text{ОП}_{\text{хп}}$  – разность между вторым и первым значениями оптической плотности холостой пробы.

### **2.4.3. Методика определения общего количества метаболитов с антиоксидантными свойствами**

Определение общей антиоксидантной способности (TAS) в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов выполняли фотометрическим методом по

методике O. Erel (2004) [126], используя тест-систему «Total Antioxidative status/capacity Perox (TAS) Kit» производства «Immundiagnostik AG» (Германия) [2-5]. Реакции проводили в пластиковом микропланшете, имеющим лунки с плоским дном.

Принцип метода основан на взаимодействии веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, в исследуемых образцах со стандартным количеством пероксида водорода при 37°C с инаktivацией последнего. Остаточный пероксид водорода в присутствии пероксидазы хрена окисляет тетраметилбензидин (ТМБ) с образованием окрашенных в голубой цвет продуктов реакции, при этом интенсивность окраски растворов обратно пропорциональна содержанию антиоксидантов в образцах. После внесения стоп-раствора (2н раствор серной кислоты), содержимое ячеек микропланшета окрашивается в желтый цвет. Оптическую плотность образцов (контрольных, стандартных и опытных) измеряли при длине волны 450 нм с помощью автоматического микропланшетного анализатора «Infinite F50», производства «ТЕСАН» (Австрия).

Реакцию для всех образцов проводили в двух рядах лунок (в дублях). В опытные лунки микропланшета вносили по 10 мкл образцов и по 100 мкл «реагента 1», содержащего 0,0014% пероксида водорода, полученного при смешивании 4,9 мл раствора А (фосфатно-цитратный буфер) и 100 мкл пероксида водорода (35% раствор), предварительно разведенного в растворе А в соотношении 1:500. Микропланшет инкубировали в течение 10 минут при 37°C. Затем к первому ряду образцов добавляли по 100 мкл «реагента 2а», содержащего 5 мл раствора А, 100 мкл раствора В, содержащего ТМБ, и 5 мкл раствора пероксидазы хрена, ко второму ряду образцов добавляли по 100 мкл «реагента 2б», содержащего 5 мл раствора А и 100 мкл раствора В, содержащего ТМБ. Инкубировали микропланшет в течение 5 минут при комнатной температуре. В лунки вносили по 50 мкл стоп-раствора (2 н. раствор серной кислоты) и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм.



Для расчетов использовали калибровочную пробу с концентрацией пероксидных продуктов 210 мкмоль/л. Для оценки точности выполнения работы применяли два контрольных раствора с концентрациями продуктов, обладающих антиоксидантными свойствами (170-230 и 195-263 мкмоль/л).

Одновременно с исследованием опытных образцов проводили реакции для калибровочной и контрольных проб аналогично методике, описанной выше, однако на первом этапе использовали соответственно по 10 мкл калибровочного и контрольных растворов.

Расчет концентраций образцов и контролей проводили по формуле (4):

$$C_{\text{оп}} = C_{\text{к}} \times (\Delta\text{ОП}_{\text{оп}} / \Delta\text{ОП}_{\text{к}}) \quad (4),$$

где:  $C_{\text{оп}}$  – концентрация антиоксидантов в опытной пробе,  $C_{\text{к}}$  – концентрация антиоксидантов в калибровочной пробе,  $\Delta\text{ОП}_{\text{оп}}$  – разность между показателями оптической плотности лунок с опытными пробами,  $\Delta\text{ОП}_{\text{к}}$  – разность между показателями оптической плотности лунок с калибровочной пробой.

#### **2.4.4. Расчет показателя выраженности оксидативного стресса – индекса оксидативного стресса (ИОС)**

Индекс оксидативного стресса рассчитывался по формуле 5 [129]:

$$\text{ИОС} = \text{TOS} / \text{TAS}, \quad (5)$$

где ИОС – индекс оксидативного стресса, TOS – значение общей окислительной способности, TAS – значение общей антиоксидантной способности.

#### **2.4.5. Методика количественного определения матриксной металлопротеиназы 9 типа (ММР-9)**

Определение концентрации ММР-9 (про-, активного и TIMP-комплексного ММР-9) в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов регенерирующих тканей выполняли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя тест-систему «Quantikine<sup>®</sup> Rat Total MMP-9» производства

«R&D Systems» (США), строго следуя инструкции. В данной тест-системе используется «сэндвич»-методика ИФА. Ее принцип заключается в том, что MMP-9 связывается с анти-MMP-9-антителами, иммобилизованными на поверхности ячеек микропланшета. Затем анти-MMP-9-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, связываются с молекулами MMP-9, захваченными первыми антителами, сорбированными в лунках.

При добавлении раствора, содержащего тетраметилбензидин (хромоген) и пероксид водорода (субстрат пероксидазы) содержимое лунок микропланшета постепенно окрашивается в голубой цвет. При внесении стопраствора, содержащего серную кислоту, ферментативная реакция в лунках останавливается, и содержимое ячеек микропланшета окрашивается в желтый цвет. Оптическую плотность каждого образца (контрольных, стандартных и опытных образцов) измеряли с помощью автоматического микропланшетного анализатора «Infinite F50» производства «TECAN» (Австрия) при длине волны 450 нм. Оптическая плотность лунок прямо пропорциональна содержанию MMP-9.

Методика ИФА с тест-системой «Quantikine<sup>®</sup> Rat Total MMP-9» включает следующие этапы. В соответствующие ячейки дозатором с одноразовыми наконечниками вносили по 50 мкл буфера, 50 мкл контрольных, стандартных и опытных образцов в дублях. Проводили инкубацию в течение 2 часов при комнатной температуре в термостате-шейкере «ES-20» производства BioSan (Латвия). Во избежание испарения растворов во время инкубации, наклеивали на верхнюю часть микропланшета чистую прозрачную клейкую пленку, входящую в состав тест-системы. После пятикратного промывания лунок микропланшета 300 мкл промывочного раствора вносили по 100 мкл конъюгата, содержащего специфические MMP-9 антитела, связанные с пероксидазой хрена и инкубировали содержимое микропланшета 2 часа при комнатной температуре в термостате-шейкере, заклеив при этом верхнюю часть микропланшета чистой пленкой из набора тест-системы. После второго цикла

пятикратного промывания ячеек микропланшета 300 мкл промывочного раствора в ячейки помещали по 100 мкл раствора, содержащего тетраметилбензидин и пероксид водорода (субстрат пероксидазы) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. По истечении времени инкубации ферментативную реакцию останавливали внесением в каждую лунку микропланшета по 100 мкл стоп-раствора, содержащего серную кислоту. Далее проводили измерение оптической плотности всех лунок микропланшета с помощью автоматического микропланшетного анализатора (ридера) «Infinite F50» производства «ТЕСАН» (Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрация MMP-9 в образцах в нанограммах на миллилитр (нг/мл) определялась программным обеспечением «Magellan for F50 V 7.0, Tecan», поставляемым производителем вместе с ридером, по калибровочной кривой, построенной по семи стандартным растворам MMP-9 в соответствии с инструкцией к тест-системе.

#### **2.4.6. Методика количественного определения ингибитора матричных металлопротеиназ 1 типа (TIMP-1)**

Определение концентрации TIMP-1 в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов регенерирующих тканей выполняли методом ИФА и тест-системы «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit TIMP-1» производства «Cloud-Clone Corp.» (США). Принцип работы тест-системы заключается в образовании «сэндвич»-комплекса. TIMP-1 связывается с анти-TIMP-1-антителами, сорбированными на поверхности лунок микропланшета. Затем анти-TIMP-1-антитела, конъюгированные с биотином, связываются с молекулами TIMP-1, захваченными первыми антителами. Затем молекулы биотина, находящиеся в сформированных комплексах, взаимодействуют с авидином, составной частью конъюгата (авидинпероксидаза хрена) вносимого на следующем этапе.

При добавлении раствора, содержащего тетраметилбензидин (хромоген) и перекись водорода (субстрат пероксидазы) в лунки

микропланшета происходит окрашивание их содержимого в голубой цвет. После внесения стоп-раствора с серной кислотой, содержимое ячеек микропланшета окрашивается в желтый цвет. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна содержанию TIMP-1. Оптическую плотность всех образцов (контрольных, стандартных и опытных образцов) измеряли с помощью автоматического микропланшетного анализатора (ридера) «Infinite F50» производства «ТЕСАН» (Австрия) при длине волны 450 нм. Оптическая плотность лунок прямо пропорциональна содержанию TIMP-1.

Процедура использования тест-системы «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit TIMP-1» включала следующие этапы. Дозатором с одноразовыми наконечниками вносили по 100 мкл контрольных, стандартных и опытных образцов в соответствующие лунки микропланшета в дублях. Далее инкубировали в течение 1 часа при 37°C в термостате-шейкере «ES-20» производства BioSan (Латвия). Во избежание испарения растворов во время инкубации заклеивали верхнюю часть микропланшета прозрачной клейкой пленкой, поставляемой в составе тест-системы. После инкубации содержимое ячеек удаляли, промывание микропланшета на данном этапе не проводили (согласно инструкции к тест-системе). В каждую лунку добавляли по 100 мкл реагента А, содержащего анти-TIMP-1-антитела, конъюгированные с биотином. Содержимое микропланшета инкубировали при 37°C в течение 1 часа в термостате-шейкере. После инкубации содержимое ячеек удаляли и проводили трехкратное промывание лунок по 300 мкл промывочного раствора. Во все лунки вносили по 100 мкл реагента В (конъюгат авидин-пероксидаза хрена), и инкубировать содержимое микропланшета 30 минут при 37°C в термостате-шейкере. Затем содержимое микропланшета удаляли и проводили пятикратное промывание ячеек по 300 мкл промывочного раствора. На заключительном этапе в лунки помещали 90 мкл раствора, содержащего тетраметилбензидин и перекись водорода (субстрат пероксидазы) и инкубировали в течение 30 минут при 37°C в темноте в термостате-шейкере. По истечении времени инкубации в каждую

ячейку микропланшета вносили по 100 мкл стоп-раствора, содержащего серную кислоту. Измеряли оптическую плотность содержимого всех лунок микропланшета с помощью автоматического микропланшетного анализатора «Infinite F50» производства «ТЕСАН» (Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрация ТИМР-1 в образцах определялась программным обеспечением «Magellan for F50 V 7.0, Tecan», поставляемым производителем вместе с ридером, по калибровочной кривой, построенной согласно инструкции к тест-системе по семи стандартным растворам ТИМР-1, и выражалась в нанограммах на миллилитр (нг/мл).

#### **2.4.7. Методика количественного определения белка**

Содержание общего белка в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов определяли фотометрически биуретовым методом [52]. В работе использовали набор реагентов для определения общего белка в сыворотке и плазме крови, производства АО «ДИАКОН-ДС», Россия.

Аналитические характеристики набора: линейная область определения концентрации общего белка – в диапазоне от 10 до 150 г/л, отклонение от линейности – не более 3%. Чувствительность определения – не более 5 г/л, коэффициент вариации – не более 3%. Принцип биуретового метода основан на образовании окрашенного в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет комплексного соединения ионов двухвалентной меди с пептидными связями в щелочной среде (рисунок 15), при этом интенсивность окраски продуктов реакции прямо пропорциональна концентрации общего белка.

В пробирки вносили исследуемые образцы сыворотки крови и супернатантов гомогенатов по 20 мкл и по 1000 мкл рабочего реактива, состоящего из сульфата меди (6,6 ммоль/л), йодида калия (15 ммоль/л), тартрата натрия-калия (32 ммоль/л) и гидроксида натрия (100 ммоль/л). В качестве контрольной пробы использовали смесь 20 мкл дистиллированной воды и 1000 мкл рабочего реактива. Калибровочная проба включала 20 мкл раствора бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 50 г/л и 1000

мкл рабочего реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут.

Величину оптической плотности калибровочной и опытных проб измеряли фотометрически при длине волны 540 нм против контрольной пробы в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см, используя спектрофотометр «BioSpectrometer», производства Eppendorf AG (Германия).

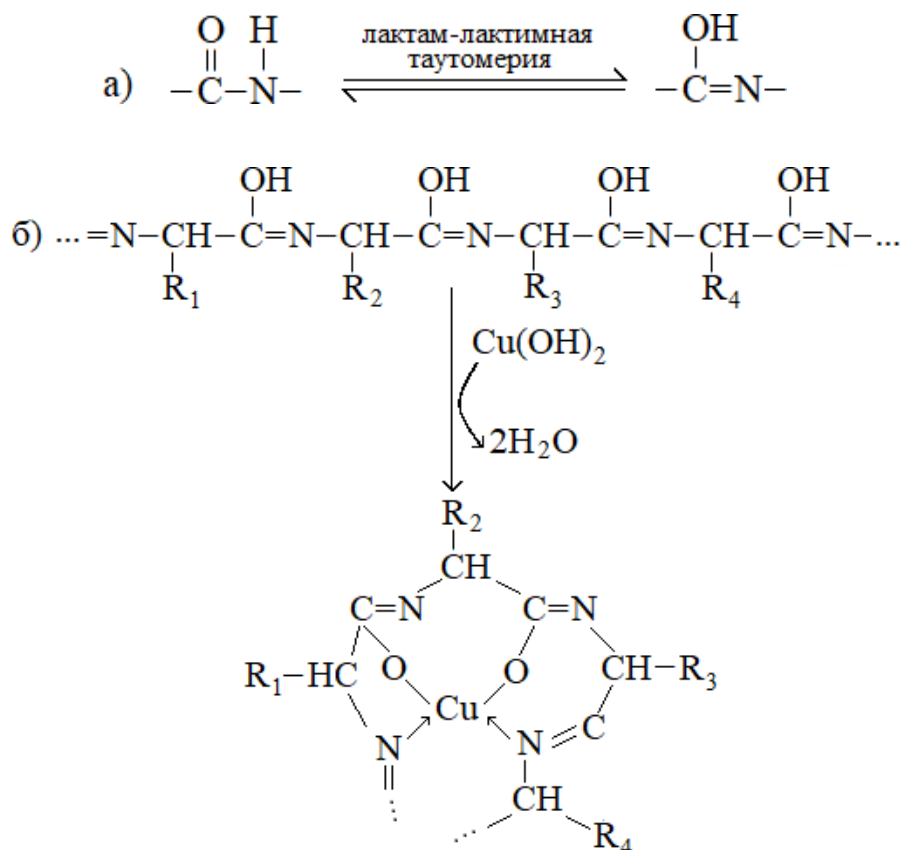


Рисунок 15 – а) лактам-лактимная таутомерия пептидной группы (в щелочной среде преобладает лактимная (енольная) форма пептидной связи), б) образование комплекса при взаимодействии гидроксида меди (II) с пептидной связью в лактимной (енольной) форме [52].

Расчет концентрации белка производили по формуле б):

$$C = (E_{\text{оп}}/E_{\text{к}}) * 50, \quad (6)$$

где:  $C$  – концентрация общего белка в опытной пробе (г/л),  $E_{\text{оп}}$  – оптическая плотность опытной пробы;  $E_{\text{к}}$  – оптическая плотность калибровочной пробы; 50 – концентрация общего белка в калибровочном растворе (г/л).

## 2.5. Методы статистического анализа

Для хранения и статистического анализа результатов, полученных в исследовании, была создана база данных в программе Microsoft® Office® Excel® 2016 (Microsoft Corporation, Tulsa, USA). Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы IBM® SPSS® Statistics 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

Объем размеров выборок рассчитаны с помощью модулей Sample Size программ COMPARE 3.85 и DESCRIBE 3.18 пакета WinPEPI 11.65 (JHAmbramson) для минимально значимых различий и величин переменных, полученных в пилотных исследованиях и из литературных данных, пороговой величине доверительной вероятности равной 5% и пороговой статистической мощности 80%.

При анализе количественных (числовых) данных использовали методы – описательной статистики, межгрупповых сравнений и корреляционный анализ [64].

Результаты экспериментального и лабораторных исследований представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ( $\bar{X} \pm SD$ ).

Перед проведением межгрупповых сравнений данных оценивали характер их распределения. Достоверность межгрупповых различий результатов в двух группах оценивали: при нормальном распределении с помощью t-критерия Стьюдента, при отличающемся от нормального распределения – критерия Манна-Уитни; в более, чем двух группах: при нормальном распределении по критерию Ньюмена-Кейлса, при отклонении от нормального распределения – по критерию Крускала-Уоллиса.

Взаимосвязь между количественными признаками определяли, используя коэффициент корреляции Пирсона (при нормальном распределении признаков), ранговый коэффициент корреляции Спирмена (при распределении признаков отличающемся от нормального).

Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА РЕПАРАЦИИ ОЖГОВЫХ РАН У КРЫС ПРИ ИХ ОБРАБОТКЕ МАЗЬЮ С НОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ

### 3.1. Результаты планиметрической оценки процесса репарации ожговых ран у крыс при их обработке мазью с новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты

В результате термического воздействия у экспериментальных животных развился ожог III Б степени с повреждением всех слоёв кожи, составляющий 4-5% от общей площади поверхности тела.

После моделирования ожога в течение суток активность животных всех групп была снижена, они принимали пищу небольшими порциями. Двигательная активность и аппетит восстановились полностью у крыс опытной группы и контрольной группы 2 на третьи сутки после нанесения термического ожога, однако у животных контрольной группы 1 наблюдались признаки физиологического дискомфорта.

Планиметрическая оценка площади термических поражений кожи на 7 сутки эксперимента показала, что у животных опытной группы абсолютные значения этого параметра были достоверно ниже в сравнении с обеими группами контроля (таблица 8).

Таблица 8 – Динамика площади дефектов кожи крыс при регенерации термического ожога

Группы животных	Площадь дефекта кожи, мм <sup>2</sup>		
	7 суток	14 суток	21 сутки
1 контрольная	215,5±3,74	126,1±3,50	43,3±5,49
2 контрольная	209,8±2,37	120,6±2,37	38,1±5,01
опытная	176,0±12,62*	48,5±6,71*	0 (рубец)*

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p < 0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2.



При этом скорость сокращения площади струпа составила в опытной группе 21,7% против 4,4% и 7,1% в контрольных группах 1 и 2 соответственно. Регистрируемые более высокие темпы восстановительных процессов в опытной группе крыс на этой стадии регенерации с позицией морфологических изменений базируются на быстром купировании воспаления и отсутствии тенденции к распространению воспалительного инфильтрата в окружающие ткани. Всё это характеризует процесс очищения раневого поля как более качественный и интенсивный и приводит к смене стадии воспаления следующей – пролиферации с образованием грануляционной ткани в области нанесенной травмы.

На 14 сутки эксперимента площади термических дефектов кожи продолжали сокращаться с разной скоростью у животных сравниваемых групп. Так, у крыс опытной группы, получавших местную терапию ожогов мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, она составила 78,4%, в то время как в контрольных группах 1 и 2 соответственно 44,0% и 46,4%. При этом показатель площади ран в абсолютном значении только у крыс опытной группы был статистически достоверно меньшим в сравнении с контрольной группой 1 (таблица 8). Очевидно, что процессы пролиферации раневого процесса под влиянием мази протекали более успешно, а именно, активно формировалась грануляционная ткань, являющаяся субстратом для роста регенерирующего эпителия. Макроскопически это приводило к достаточно быстрому сокращению ареала кожного дефекта. Судя по скорости уменьшения площади струпов у животных обеих контрольных серий, эти процессы были не столь активными.

На 21 сутки эксперимента зона бывшего ожога у крыс опытной группы была представлена соединительнотканым рубцом и практически неотличима от неповрежденной кожи, а периферии восстановился шерстный покров (рисунок 16а). Отторжение струпа произошло в среднем на 19-й день ( $19,1 \pm 0,6$ ) наблюдения, что свидетельствует о полном завершении регенераторных процессов под влиянием 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ.

У крыс обеих контрольных групп регенерация ожога была еще не завершена на 19-е сутки. Так, в контрольной группе 1 полную эпителизацию и образование рубца отмечали в среднем лишь на 23-е сутки ( $23,4 \pm 1,0$ ), в то время как на 21 сутки площадь остаточного ожогового дефекта еще имела значение  $43,3 \pm 5,49$  мм<sup>2</sup>, что составляло 19,1% от исходной в начале эксперимента (рисунок 16б). В контрольной группе 2 ко времени выведения животных из эксперимента (21-е сутки) остаточная площадь дефекта составляла  $38,1 \pm 5,01$  мм<sup>2</sup> или 16,8% от исходной. Полное же заживление с формированием соединительнотканного рубца произошло на 22-е ( $22,1 \pm 0,9$ ) сутки, что по времени достоверно не отличалось от контрольной группы 1 ( $p > 0,05$ ).

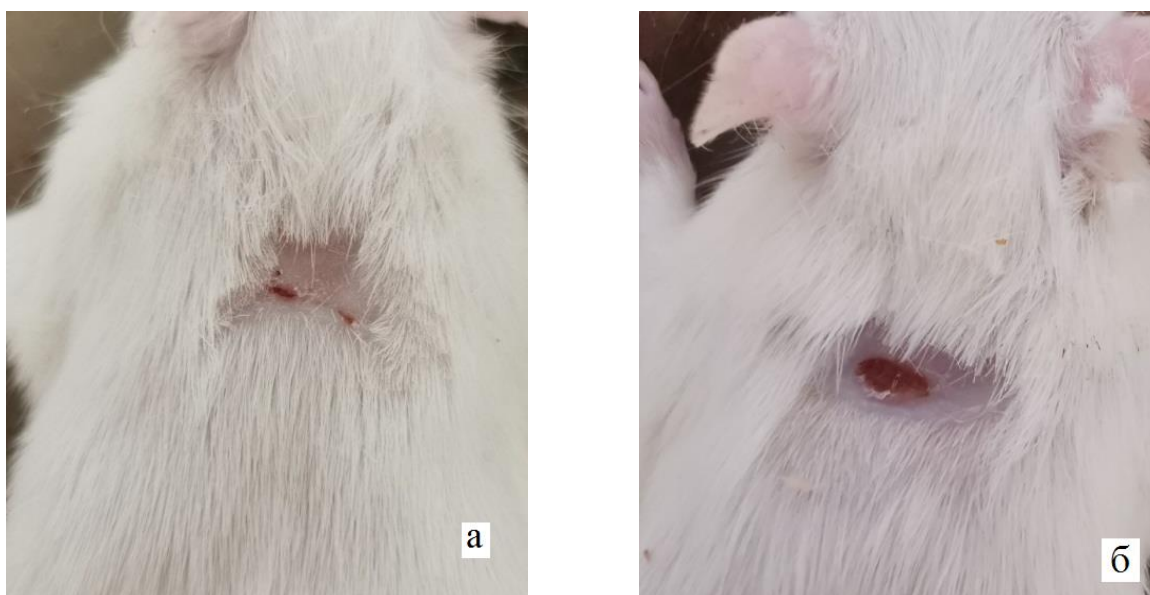


Рисунок 16 – внешний вид области бывшего ожога на 21 день эксперимента: а – животное опытной группы, б – животное контрольной группы 1.

Таким образом, отсутствие статистически значимых различий площадей ожоговых дефектов между контрольными группами 1 и 2 на всех стадиях раневого процесса свидетельствует о том, что аппликация только мазевой основы не оказывает стимулирующего эффекта. При этом репаративный потенциал нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в виде

2% мази реализуется местно уже на стадиях воспаления и пролиферации. Прорегенераторные свойства исследуемого вещества проявились в достоверном ускорении заживления экспериментальных термических ожогов кожи.

### **3.2. Характеристика резорбции нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при местных аппликациях мази с этим веществом на ожоговые раны кожи крыс**

Построение хроматограмм осуществляли по ионному току в режиме множественных реакций (MRM). MRM-переходы для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамата и сульфацетамида составили соответственно  $m/z$  138,0  $\rightarrow$   $m/z$  123,0,  $m/z$  174,0  $\rightarrow$   $m/z$  114,0 и  $m/z$  215,2  $\rightarrow$   $m/z$  156,0.

Анализ результатов хроматографического определения показал, что время удерживания 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамовой кислоты и сульфацетамида (внутренний стандарт) составило соответственно 1,0, 1,25 и 1,2 минут (рисунок 17).

Для разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС были определены метрологические параметры, нижний предел детекции и нижний предел количественного определения для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты составили 0,25 и 0,5 нг/мл соответственно.

Для построения калибровочного графика, описывающего зависимость нормированного сигнала аналита от концентрации, использовали регрессию без нормирования. Для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты аналитический диапазон составил от 0,5 нг/мл до 250 нг/мл в пересчете на 2-Э-6-М-3-ПП N-A-6-АГ (рисунки 18 и 19).

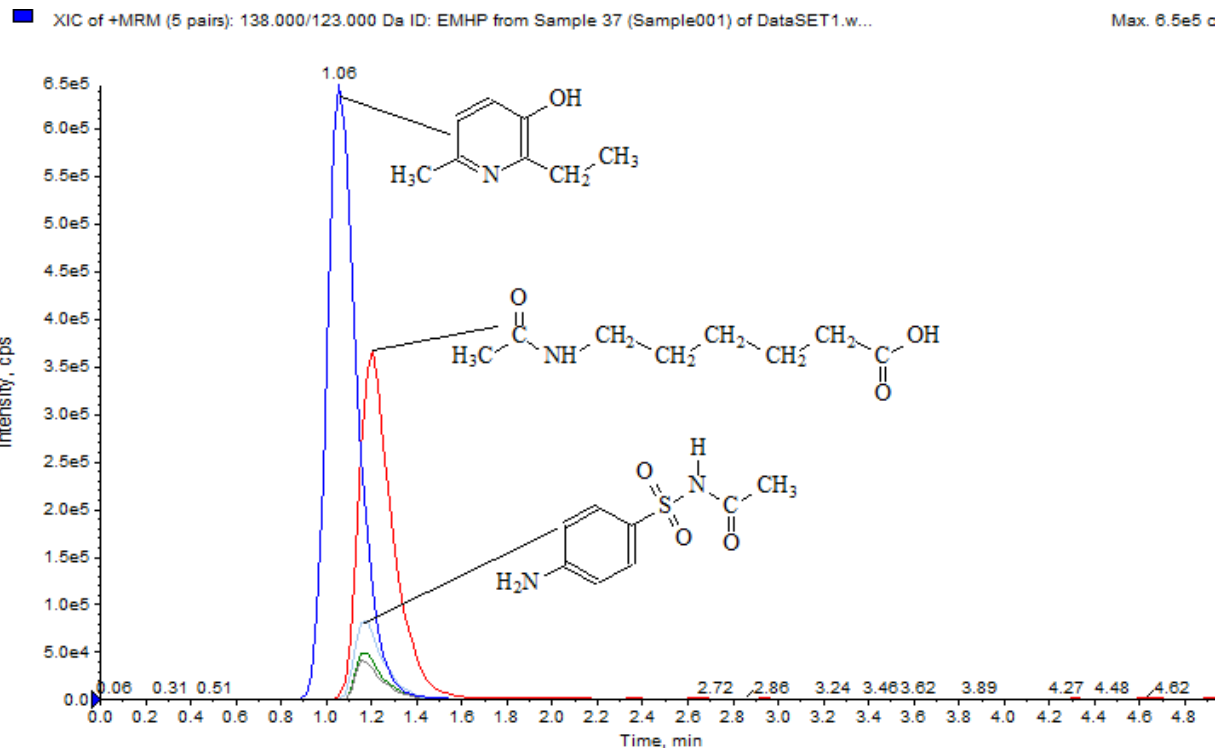


Рисунок 17 – Хроматограмма образца плазмы крови 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата концентрацией 50 нг/мл

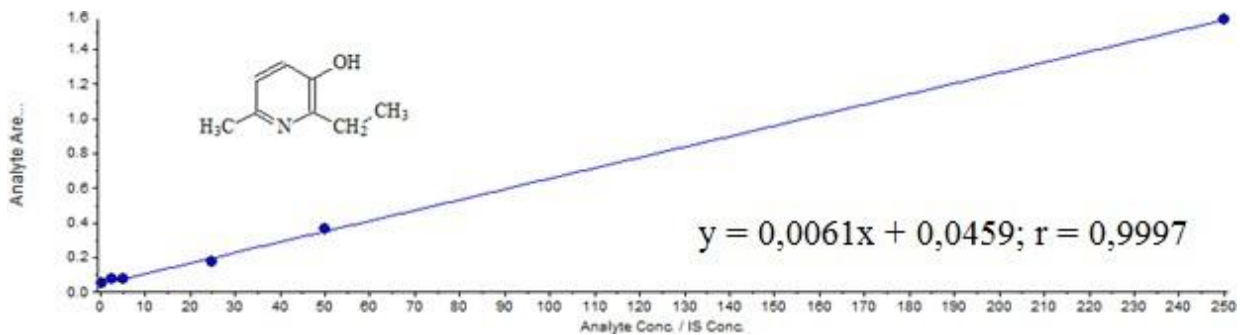


Рисунок 18. Калибровочная прямая для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в плазме крови крыс в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (по оси X представлена концентрация аналита в нг/мл, по оси Y – отношение площади хроматографического пика 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина к площади пика сульфацетамида)

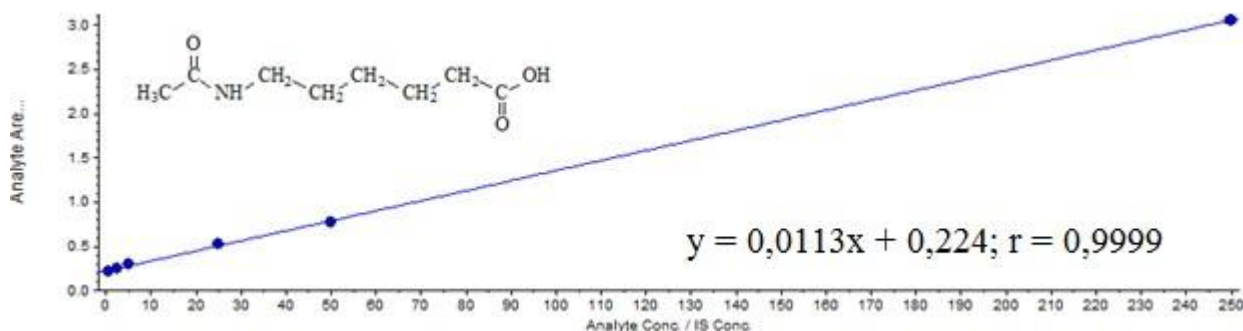


Рисунок 19 – Калибровочная прямая для количественного определения ацексамовой кислоты в плазме крови крыс в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (по оси X представлена концентрация аналита в нг/мл, по оси Y – отношение площади хроматографического пика ацексамовой кислоты к площади пика сульфацетамида)

Для установления значения матричного эффекта были проанализированы образцы, приготовленные на чистом растворителе, и образцы, содержащие экстракт плазмы крови крыс. Матричный эффект был установлен для трех уровней концентрации 2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ: 1 нг/мл, 100 нг/мл и 200 нг/мл. Результаты исследования показали, что величина матричного эффекта не превышала 15% для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты на всех уровнях концентраций.

Оценку степени извлечения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты из плазмы крови крыс осуществляли для трех уровней концентраций 2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ (1,0 нг/мл, 100 нг/мл и 200 нг/мл) путем сравнения площадей хроматографических пиков экстрагированных образцов и образцов на чистом растворителе с добавлением экстракта матрицы. Для всех анализируемых концентраций степень извлечения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты составила более 90%.

Результаты исследования показали, что через 2 часа после однократного нанесения мази концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты в плазме крови крыс составили  $18,05 \pm 0,96$  нг/мл и  $21,62 \pm 1,12$  нг/мл соответственно в пересчете на 2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ.

Полученные результаты свидетельствуют о незначительной резорбции исследуемого вещества через поверхность ожогового дефекта.

## ГЛАВА 4

# ДИНАМИКА БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ГОМОГЕНАТОВ РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В ОЖГОВЫХ РАНАХ КРЫС МАЗЬЮ С НОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ

### 4.1. Результаты количественного определения показателей оксидативного стресса в динамике эксперимента

Раневой процесс любой этиологии сопровождается усилением свободнорадикальных реакций. В настоящем исследовании проведена оценка динамики активности оксидативного стресса (ОС) в организме животных в ходе местной обработки экспериментальных термических ожогов кожи крыс новым производным АК – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ).

Результаты количественного определения показателей ОС – общей оксидативной активности (Total Oxidative status, TOS), общей антиоксидантной активности (Total Antioxidative status, TAS) и индекса ОС (ИОС), являющегося их отношением, в супернатантах гомогенатов тканей из области раневых дефектов и в сыворотке крови на 7 сутки эксперимента представлены в таблицах 9 и 10 соответственно.

У животных всех групп на 7 сутки эксперимента уровни TOS и TAS, выраженные в мкмоль/л на 1 мг белка в биоптате, не различались между собой. Тогда как при представлении этих показателей в мкмоль/л на биоптат уровни TOS также не различались между всеми группами, а уровень TAS у животных опытной группы был достоверно выше, чем в обеих контрольных группах. При этом сравнение средних арифметических значений ИОС продемонстрировало тот факт, что его значение в опытной группе было статистически значимо ниже, чем в контрольных группах.

Таблица 9 – Показатели оксидативного стресса в гомогенатах регенерирующих тканей крыс на 7 сутки эксперимента

Группы животных		Показатели		
		TOS, мкмоль/л	TAS, мкмоль/л	ИОС, ед.
Контрольная 1	на биоптат	17,3±2,03	2,46±0,17	7,09±0,80
	на 1 мг белка	1,03±0,15	0,15±0,02	
Контрольная 2	на биоптат	17,0±2,52	2,67±0,23	6,84±0,94
	на 1 мг белка	1,11±0,19	0,18±0,03	
Опытная	на биоптат	15,4±2,35	4,21±0,65*	3,93±0,57*
	на 1 мг белка	0,73±0,10	0,21±0,04	

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p<0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольными группами 1 и 2.

Учитывая, что выраженность ОС характеризуется величиной ИОС, то есть отношением TOS и TAS, а не их абсолютными значениями, а также описанную выше неоднозначность анализа значений TOS и TAS, выраженных двумя разными способами, при последующем анализе активности ОС в каждый срок наблюдения и в динамике применяли значения ИОС, тем более, что они одинаковы для TOS и TAS, выраженными как в мкмоль/л биоптат, так и в мкмоль/л на 1 мг белка в биоптате.

Значение ИОС на 7 сутки эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей у животных опытной группы, получавших аппликации мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, было достоверно ниже, чем в контрольных группах 1 и 2 на 44,6% и 42,5% соответственно (оба  $p<0,05$ ). При этом различия значений ИОС в контрольных группах животных 1 и 2 были статистически не значимыми.

В крови крыс опытной группы на 7 сутки эксперимента наметилась тенденция к снижению активности ОС относительно показателей у животных обеих контрольных групп (таблица 10). Так, значение ИОС у животных опытной группы по сравнению с крысами контрольных групп 1 и 2 составило 84,9% и 91,1% соответственно ( $p<0,1$ ), при чем значение ИОС у животных обеих контрольных групп не различались между собой ( $p>0,05$ ).



Таблица 10 – Показатели оксидативного стресса в сыворотке крови крыс на 7 сутки эксперимента

Группы животных	Показатели		
	TOS, мкмоль/л	TAS, мкмоль/л	ИОС, ед.
Контрольная 1	17,6±1,48	4,82±0,54	4,45±0,77
Контрольная 2	57,2±10,84	19,9±4,96	4,15±0,72
Опытная	58,0±10,84	21,2±4,93	3,78±0,62*

Примечание: \* – имеется тенденция различий ( $p < 0,1$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольными группами 1 и 2.

Однако в сыворотке крови достоверных различий показателей, характеризующих ОС, между животными контрольных групп 1 и 2 на данном этапе эксперимента не обнаружено.

На 14 сутки исследования, при продолжающемся процессе репарации ран, абсолютные значения TOS и TAS, выраженными как в мкмоль/л биоптат, так и в мкмоль/л на 1 мг белка в биоптате, в гомогенатах регенерирующих тканей всех обследованных групп крыс увеличились в различной степени, однако их отношение (ИОС) четко показало динамику активности ОС по сравнению с соответствующими результатами на 7 сутки эксперимента. Так, выявлено, что значения ИОС у животных контрольных групп 1 и 2 были ниже соответственно на 15,9% ( $p > 0,05$ ) и на 30,9% ( $p < 0,05$ ), а в опытной группе – на 30,0% ( $p < 0,05$ ), чем на предыдущей неделе исследования (таблицы 11 и 12).

Сравнение значений ИОС на 14 сутки эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей (таблица 11) у животных опытной группы, как и предыдущий срок наблюдения, было достоверно ниже, чем в контрольных группах 1 и 2 на 53,9% и 41,7% соответственно (оба  $p < 0,05$ ).

Значения ИОС в гомогенатах регенерирующих тканей крыс обеих контрольных групп на данном этапе исследования достоверно не различались.

Таблица 11 – Показатели оксидативного стресса в гомогенатах регенерирующих тканей крыс на 14 сутки эксперимента

Группы животных		Показатели		
		TOS, мкмоль/л	TAS, мкмоль/л	ИОС, ед.
Контрольная 1	на биоптат	173,3±11,9	35,1±4,05	5,96±0,83
	на 1 мг белка	11,1±1,13	2,19±0,28	
Контрольная 2	на биоптат	153,9±12,2	38,6±4,88	4,72±0,52
	на 1 мг белка	13,2±1,85	3,06±0,43	
Опытная	на биоптат	161,9±9,96	61,8±4,22	2,75±0,26*
	на 1 мг белка	8,47±0,54	3,33±0,35	

Примечание (в таблицах 11–14): \* – различие статистически значимо ( $p<0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2.

На 14 сутки наблюдения показатели ИОС в крови крыс (таблица 12) всех исследованных групп так же, как и в гомогенатах регенерирующих тканей, были ниже, чем на предыдущей неделе исследования (таблицы 10 и 12): у животных контрольных групп 1 и 2 – на 30,1% ( $p>0,05$ ) и на 33,5% ( $p<0,05$ ) соответственно, а в опытной группе – на 58,5% ( $p<0,05$ ).

У животных опытной группы в сыворотке крови и гомогенатах регенерирующих тканей на 14 сутки эксперимента значение ИОС было достоверно ниже по сравнению с крысами контрольных групп 1 и 2 соответственно на 49,5% и 43,1% ( $p<0,05$ ) (таблица 12). На второй неделе эксперимента значения ИОС в сыворотке крови животных обеих контрольных групп не различались между собой ( $p>0,05$ ).

Выявленная тенденция – понижение выраженности ОС по мере заживления ожоговых ран крыс, как спонтанного, так и при экспериментальном местном лечении мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ – усиливалась на 21 сутки исследования.

Таблица 12 – Показатели оксидативного стресса в сыворотке крови крыс на 14 сутки эксперимента

Группы животных	Показатели в крови		
	TOS, мкмоль/л	TAS, мкмоль/л	ИОС, ед.
Контрольная 1	156,3±43,4	63,8±10,9	3,11±0,78
Контрольная 2	159,4±46,9	75,4±12,9	2,76±0,62
Опытная	125,3±20,43	80,4±10,8	1,57±0,20*

В гомогенатах регенерирующих тканей в данный срок наблюдения по сравнению со второй неделей эксперимента значения ИОС у крыс контрольных групп 1 и 2 были ниже соответственно на 84,5% ( $p>0,05$ ) и на 81,8% ( $p<0,05$ ), а в опытной группе – на 76,0% ( $p<0,05$ ) (таблицы 13 и 14).

Таблица 13 – Показатели оксидативного стресса в гомогенатах регенерирующих тканей крыс на 21 сутки эксперимента

Группы животных		Показатели		
		TOS, мкмоль/л	TAS, мкмоль/л	ИОС, ед.
Контрольная 1	на биоптат	151,9±8,02	170,1±11,6	0,92±0,04
	на 1 мг белка	7,73±0,24	8,55±0,31	
Контрольная 2	на биоптат	148,1±6,80	180,9±10,6	0,86±0,07
	на 1 мг белка	7,38±0,68	8,87±0,63	
Опытная	на биоптат	102,9±5,12	162,3±7,64	0,66±0,05*
	на 1 мг белка	4,92±0,31	7,82±0,55	

На 21 сутки эксперимента (таблица 13) ИОС в гомогенатах тканей животных опытной группы был достоверно ниже, чем в контрольных группах 1 и 2 соответственно на 28,3% и 23,3%, соответственно (оба  $p<0,05$ ). Между значениями данного показателя в контрольных группах статистически значимого различия выявлено не было.

К третьей неделе экспериментального исследования значения ИОС в крови животных всех групп, как и в гомогенатах регенерирующих тканей, были ниже, чем на второй неделе исследования (таблицы 11 и 13): у животных контрольных групп 1 и 2 – на 30,1% ( $p>0,05$ ) и на 33,5% ( $p<0,05$ ) соответственно, опытной группы – на 58,5% ( $p<0,05$ ).

Таблица 14 – Показатели оксидативного стресса в сыворотке крови крыс на 21 сутки эксперимента

Группы животных	Показатели в крови		
	TOS, мкмоль/л	TAS, мкмоль/л	ИОС, ед.
Контрольная 1	144,1±24,38	142,1±7,06	0,98±0,13
Контрольная 2	135,0±26,12	146,8±8,66	0,86±0,12
Опытная	58,3±9,54	126,3±8,65	0,50±0,08*

В сыворотке крови животных опытной группы на 21 сутки эксперимента значение ИОС было статистически значимо ниже, чем у крыс контрольных групп 1 и 2 соответственно на 49,0% и 41,8% ( $p < 0,05$ ) (таблица 14). На данном сроке эксперимента значения ИОС в сыворотке крови животных обеих контрольных групп различались между собой недостоверно ( $p > 0,05$ ).

У 10 интактных крыс в сыворотке крови концентрации TOS составила  $65,0 \pm 9,13$  мкмоль/л, TAS –  $114,4$  мкмоль/л, индекс ОС –  $0,61 \pm 0,09$  ед.

\* \* \*

Анализ показателей ОС позволил сделать заключение о том, что активность окислительных процессов и антиоксидантной защиты, а, следовательно, выраженность ОС в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови зависит от стадии раневого процесса. Абсолютные значения TOS в обоих исследованных биоматериалах в ходе эксперимента повышались на 7 и 14 сутки, снижались на 21 день исследования. Абсолютные значения TAS в исследованных биоматериалах по мере заживления ожоговых ран повышались на всех сроках наблюдения. Показатель ИОС позволил однозначно проследить тенденцию выраженности ОС при заживлении ожоговых ран при спонтанном заживлении, а также в эксперименте по использованию курса аппликаций новым производным N-A-6-AG кислоты.

Проведенное исследование показало, что значения ИОС, характеризующие выраженность ОС в регенерирующих тканях и крови, по мере заживления термических ожогов достоверно снижались, как при спонтанном заживлении, так и в эксперименте при обработке ран мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N- А-6-АГ. При этом достоверных различий значений ИОС между обеими контрольными группами на всех этапах наблюдения не выявлено. Тогда, как, значения ИОС в обоих исследованных биоматериалах статистически значимо были ниже на всех этапах эксперимента у животных, получавших на ожоговые раны курс аппликаций мазью с новым производным ацексамовой кислоты – 2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ.

#### **4.2. Результаты количественного определения MMP-9 и TIMP-1 в динамике эксперимента**

В данном разделе приводятся результаты изучения динамики уровней матриксной металлопротеиназы 9 типа (MMP-9), ингибитора матриксных металлопротеиназ 1 типа (TIMP-1) и их отношения (MMP-9/TIMP-1) [208] в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови при проведении курса аппликаций мази с новым производным ацексамовой кислоты – 2-Э-6-М-3- ГП N-А-6-АГ на экспериментальные термические ожоги кожи крыс на этапах регенерации ран.

На 7 сутки эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей концентрации MMP-9, выраженные в нг/мл на биоптат, во всех группах животных не различались между собой (таблица 15).

Тогда как в опытной группе уровень MMP-9, выраженный в нг/мл на 1 мг белка в биоптате, был достоверно ниже, чем в обеих контрольных группах (оба  $p < 0,05$ ), между которыми по данному показателю различие не выявлено ( $p > 0,05$ ). Концентрации TIMP-1, выраженные двумя разными способами – в нг/мл на биоптат или на 1 мг белка в биоптате, не различались между всеми обследованными группами крыс. При этом сравнение соотношений MMP-9/TIMP-1 показало, что его значение в опытной группе было достоверно ниже, чем в контрольных группах 1 и 2 на 31,4% и 25,8% соответственно (оба

$p < 0,05$ ). При этом различия значений коэффициента ММР-9/ТИМР-1 в контрольных группах животных 1 и 2 были статистически не значимыми.

Таблица 15 – Уровни ММР-9, ТИМР-1 и ММР-9/ТИМР-1 в гомогенатах регенерирующих тканей крыс на 7 сутки эксперимента

Группы животных		Показатели		
		ММР-9, нг/мл	ТИМР-1, нг/мл	ММР-9/ ТИМР-1, ед.
Контрольная 1	на биоптат	527,6±45,2	7,58±0,45	70,3±4,83
	на 1 мг белка	29,1±1,65	0,42±0,02	
Контрольная 2	на биоптат	548,0±65,9	8,14±0,48	65,0±5,28
	на 1 мг белка	32,0±1,86	0,51±0,02	
Опытная	на биоптат	410,3±32,5	8,39±0,44	48,2±1,84*
	на 1 мг белка	18,8±0,63*	0,39±0,01	

Примечание (в таблицах 15–20): \* – различие статистически значимо ( $p < 0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2.

Поскольку ТИМР-1 является специфическим ингибитором ММР-9, то протеолитический эффект ММР-9 зависит от соотношения фермента и его ингибитора. По этой причине при дальнейшем анализе результатов исследования внимание уделялось сравнению средних значений ММР-9/ТИМР-1 в обследованных группах животных на всех этапах регенерации ожоговых ран кожи.

В крови крыс опытной группы на 7 сутки эксперимента значения ММР-9, ТИМР-1 и ММР-9/ТИМР-1 были статистически значимо ниже по сравнению с соответствующими показателями крыс контрольных групп 1 и 2 (таблица 16).

Так, в данный срок наблюдения среднее значение ММР-9/ТИМР-1 в крови крыс опытной группы, получавших аппликации мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, было достоверно меньше, чем в обеих контрольных группах на 47,9% и 33,0% соответственно (оба  $p < 0,05$ ). Значения ММР-9/ТИМР-1 у животных обеих контрольных групп не различались между собой ( $p > 0,05$ ).

На 14 сутки исследования в гомогенатах регенерирующих тканей абсолютные значения концентраций ММР-9 и ТИМР-1, выраженные в нг/мл биоптат, изменились разнонаправленно (таблицы 15 и 17).

Таблица 16 – Уровни MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-1 в сыворотке крови крыс на 7 сутки эксперимента

Группы животных	Показатели		
	MMP-9, нг/мл	TIMP-1, нг/мл	MMP-9/TIMP-1, ед.
Контрольная 1	12,1±0,98	3,23±0,39	4,32±0,49
Контрольная 2	11,9±2,01	3,95±0,62	3,36±0,30
Опытная	6,75±0,58	3,43±0,37	2,25±0,28*

Таблица 17 – Уровни MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей крыс на 14 сутки эксперимента

Группы животных		Показатели		
		MMP-9, нг/мл	TIMP-1, нг/мл	MMP-9/TIMP-1, ед.
Контрольная 1	на биоптат	656,0±46,0	8,27±0,43	78,9±3,24
	на 1 мг белка	39,3±1,05	0,51±0,02	
Контрольная 2	на биоптат	506,0±39,2	6,96±0,43	72,5±2,20
	на 1 мг белка	38,9±1,06	0,54±0,01	
Опытная	на биоптат	365,8±20,6	10,4±0,63	35,7±1,05*
	на 1 мг белка	18,7±0,27	0,53±0,01	

Те же показатели, выраженные в нг/мл на 1 мг белка в биоптате, во всех обследованных группах крыс увеличились ( $p>0,05$ ), за исключением уровня MMP-9 у животных опытной группы, который практически не изменился по сравнению с предыдущим сроком эксперимента. Анализ средних значений MMP-9/TIMP-1 позволил обнаружить динамику протеолиза в регенерирующих тканях ожоговых ран кожи во вторую неделю эксперимента по сравнению с первой: недостоверное повышение у животных обеих контрольных групп и достоверное снижение у крыс опытной группы – на 25,9% ( $p<0,05$ ).

Значения MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей на 14 сутки эксперимента (таблица 17) у животных опытной группы, как и предыдущий срок наблюдения, были достоверно ниже, чем в контрольных группах 1 и 2 на 54,8% и 50,8% соответственно (оба  $p<0,05$ ). У крыс обеих контрольных групп на данном этапе исследования значения данного

показателя в гомогенатах регенерирующих тканей достоверно не различались.

На 14 сутки эксперимента в крови крыс всех обследованных групп концентрации MMP-9 и TIMP-1 были выше, чем на предыдущей неделе исследования, хотя недостоверно (таблицы 16 и 18).

Таблица 18 – Уровни MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-1 в сыворотке крови крыс на 14 сутки эксперимента

Группы животных	Показатели		
	MMP-9, нг/мл	TIMP-1, нг/мл	MMP-9/TIMP-1, ед.
Контрольная 1	15,7±1,18	4,06±0,44	4,16±0,30
Контрольная 2	14,7±1,02	4,25±0,44	4,41±0,81
Опытная	8,86±0,82	4,91±0,44	1,85±0,19*

Значения MMP-9/TIMP-1 в крови животных обеих контрольных групп практически не отличались от аналогичных на 7 сутки эксперимента ( $p>0,05$ ), а в крови крыс опытной группы имелась тенденция к снижению – на 17,8% ( $p<0,1$ ).

На 14 сутки эксперимента у животных опытной группы крыс в крови, так же как и гомогенатах регенерирующих тканей, значение MMP-9/TIMP-1 было достоверно ниже по сравнению с крысами контрольных групп 1 и 2 соответственно на 55,5% и 58,0% ( $p<0,05$ ) (таблица 18). На второй неделе эксперимента значения MMP-9/TIMP-1 в сыворотке крови животных обеих контрольных групп между собой не различались ( $p>0,05$ ).

На 21 сутки исследования в гомогенатах регенерирующих тканей абсолютные значения концентраций MMP-9 выраженные, как в нг/мл на биоптат, так и в нг/мл на 1 мг белка в биоптате, во всех обследованных группах стали ниже, чем в предыдущий срок наблюдения (таблицы 17 и 19). Причем для уровней MMP-9, выраженных в нг/мл на биоптат, эти различия были статистически значимы (все  $p<0,05$ ). Различия концентраций TIMP-1, выраженных обоими способами, в описываемые сроки у животных всех групп изменились не достоверно. При этом в гомогенатах регенерирующих тканей на третьей неделе наблюдения по сравнению со второй неделей эксперимента



значения MMP-9/TIMP-1 у крыс контрольных групп 1 и 2 были ниже соответственно на 37,9% и на 35,4% ( $p<0,05$ ), а в опытной группе – на 37,0% (все  $p<0,05$ ) (таблицы 17 и 19).

Таблица 19 – Уровни MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей крыс на 21 сутки эксперимента

Группы животных		Показатели		
		MMP-9, нг/мл	TIMP-1, нг/мл	MMP-9/TIMP-1, ед.
Контрольная 1	на биоптат	502,2±38,3	10,2±0,75	49,0±0,84
	на 1 мг белка	25,0±0,41	0,51±0,01	
Контрольная 2	на биоптат	469,0±47,1	9,74±0,61	46,8±1,96
	на 1 мг белка	21,2±0,51	0,46±0,01	
Опытная	на биоптат	290,5±20,1	12,8±0,62	22,5±0,70
	на 1 мг белка	13,4±0,43*	0,60±0,01	

В гомогенатах регенерирующих тканей животных опытной группы на 21 сутки эксперимента (таблица 19) значение MMP-9/TIMP-1 был достоверно ниже, чем в контрольных группах 1 и 2 соответственно на 54,1,3% и 52,0%, соответственно (оба  $p<0,05$ ). Между значениями данного показателя в контрольных группах статистически значимого различия выявлено не было.

На 21 сутки эксперимента концентрации MMP-9 в крови крыс всех обследованных групп достоверно снизилась по сравнению с данными показателями на предыдущей неделе наблюдения (таблицы 18 и 20), а уровень TIMP-1 у животных опытной группы статистически значимо повысился, тогда как у крыс обеих контрольных группах – практически не изменился.

Таблица 20 – Уровни MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-1 в сыворотке крови крыс на 21 сутки эксперимента

Группы животных	Показатели		
	MMP-9, нг/мл	TIMP-1, нг/мл	MMP-9/TIMP-1, ед.
Контрольная 1	9,32±0,90	4,55±0,49	2,15±0,12
Контрольная 2	8,40±0,88	4,68±0,44	1,89±0,18
Опытная	5,34±0,39	6,49±0,50	0,88±0,08*

Значения ММР-9/ТИМР-1 в крови крыс всех обследованных групп были достоверно ниже по сравнению с данными параметрами на 14 сутки эксперимента ( $p < 0,05$ ): в контрольных группах 1 и 2 на 48,3% и 57,1%, в опытной группе – на 52,4%.

На третьей неделе эксперимента у животных опытной группы животных в крови, так же как и гомогенатах регенерирующих тканей, значение ММР-9/ТИМР-1 было достоверно ниже по сравнению с данным параметром у крыс контрольных групп 1 и 2 соответственно на 59,0% и 53,4% ( $p < 0,05$ ) (таблица 20). В данный период эксперимента значения ММР-9/ТИМР-1 в сыворотке крови животных обеих контрольных групп не различались между собой ( $p > 0,05$ ).

У 10 интактных крыс в сыворотке крови концентрации ММР-9 составила  $4,89 \pm 0,34$  нг/мл, ТИМР-1 –  $7,45 \pm 0,61$  нг/мл, их соотношение –  $0,71 \pm 0,06$  ед.

Оценка динамики концентраций матриксной металлопротеиназы 9 типа и тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 типа при моделировании термического ожога кожи у крыс выявила изменение их баланса в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови в зависимости от стадии раневого процесса. Так, абсолютные значения ММР-9 в обоих исследованных материалах были повышены на 7 и 14 сутки, а на 21 сутки эксперимента достоверно снижались. Концентрации ТИМР-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови увеличивались в процессе репарации ран. Отношение ММР-9 и ТИМР-1, характеризующее протеолитическую способность желатиназы ММР-9, снижалось по мере заживления ожоговых ран. Важно, что в группе животных, получавших на ожоговые раны курс аппликации мазью с 2-Э-6- М-3-ГП N-A-6-АГ, такое снижение было достоверным и происходило уже на второй неделе эксперимента, тогда, как в контрольных группах только на третьей неделе.

Таким образом, результаты эксперимента позволяют сделать вывод о том, что репарация термических ожогов кожи крыс, стимулированная курсом аппликаций на раневые поверхности мазью, содержащей новое производное

ацексамовой кислоты – 2% 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, протекает на фоне снижения в тканях протеолитической активности ММР-9.

### 4.3. Результаты корреляционного анализа между площадью раневых дефектов и биохимическими показателями в гомогенатах регенерирующих тканей

Для установления наличия взаимосвязи между изучаемыми процессами нами был проведен корреляционный анализ зависимости площадей раневых дефектов от показателей оксидативного стресса (S и ИОС), площадей раневых дефектов от протеолитической активности ММР-9 (S и ММР-9/ТИМР-1), а также протеолитической активности ММР-9 от активности оксидативного стресса (ММР-9/ТИМР-1 и ИОС) на 7, 14 и 21 сутки эксперимента.

Корреляционный анализ зависимости ИОС и ММР-9/ТИМР-1 из области ожогов позволил установить корреляцию средней степени между ними только у крыс опытной группы на 7 и 14 сутки эксперимента, соответственно  $r_s=0,56$  и  $r_s=0,64$  ( $p<0,05$ ) (рисунки 20 и 21).

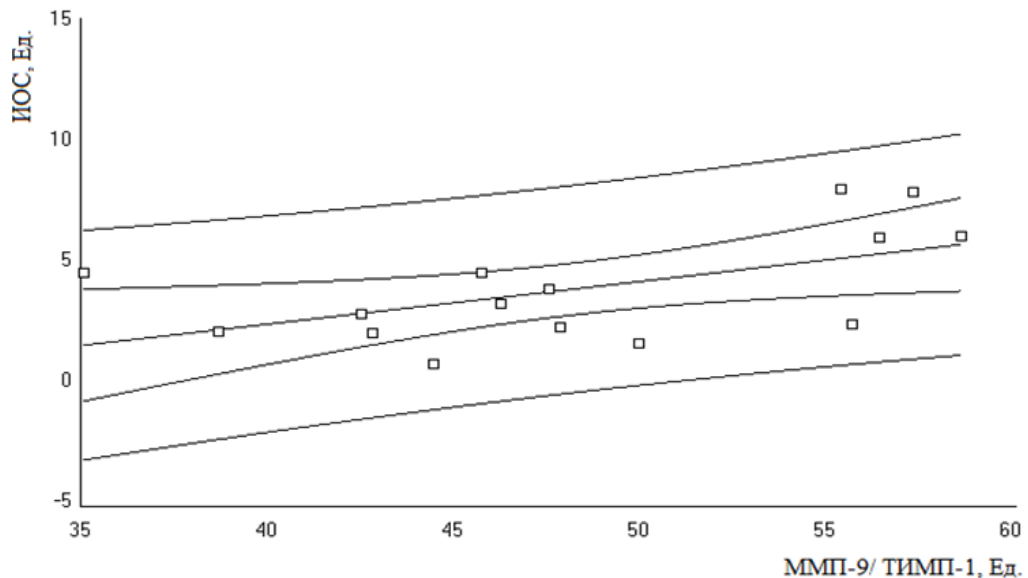


Рисунок 20 – График корреляции уровней ИОС и ММР-9/ТИМР-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и площади раневых дефектов у крыс опытной группы на 7 сутки эксперимента ( $r_s=0,56$ )

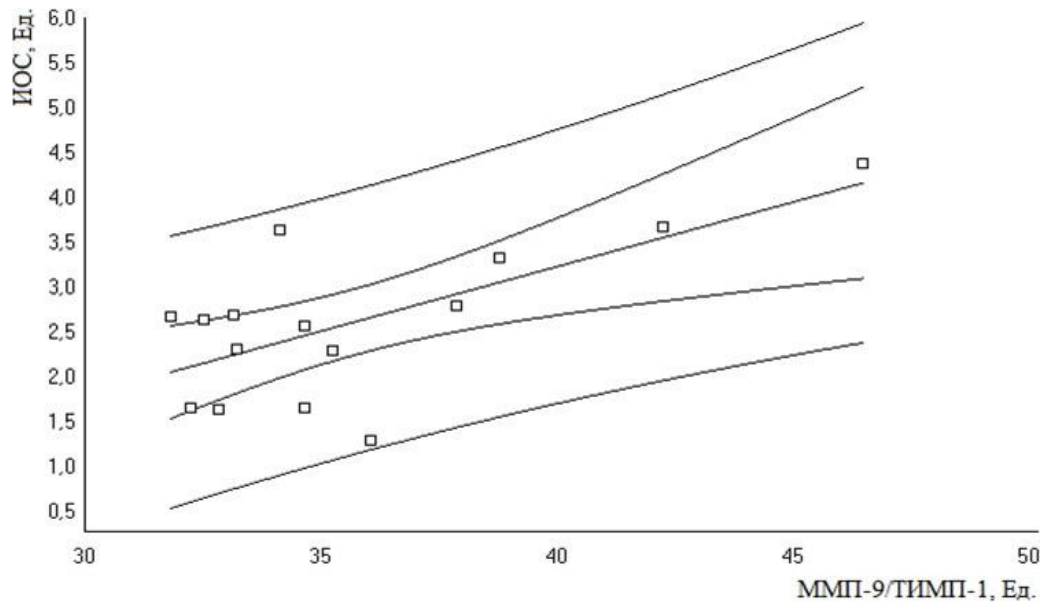


Рисунок 21 – График корреляции уровней ИОС и ММП-9/ТИМР-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и площади раневых дефектов у крыс опытной группы на 14 сутки эксперимента ( $r_s=0,64$ )

В указанные сроки исследования у животных, получавших аппликации мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, наблюдалась достоверная корреляция ( $r_s=0,66$  и  $r_s=0,53$  соответственно) между площадями ожоговых дефектов и протеолитической активностью ММП-9 (ММП-9/ТИМР-1) в гомогенатах регенерирующих тканей (рисунки 22 и 23).

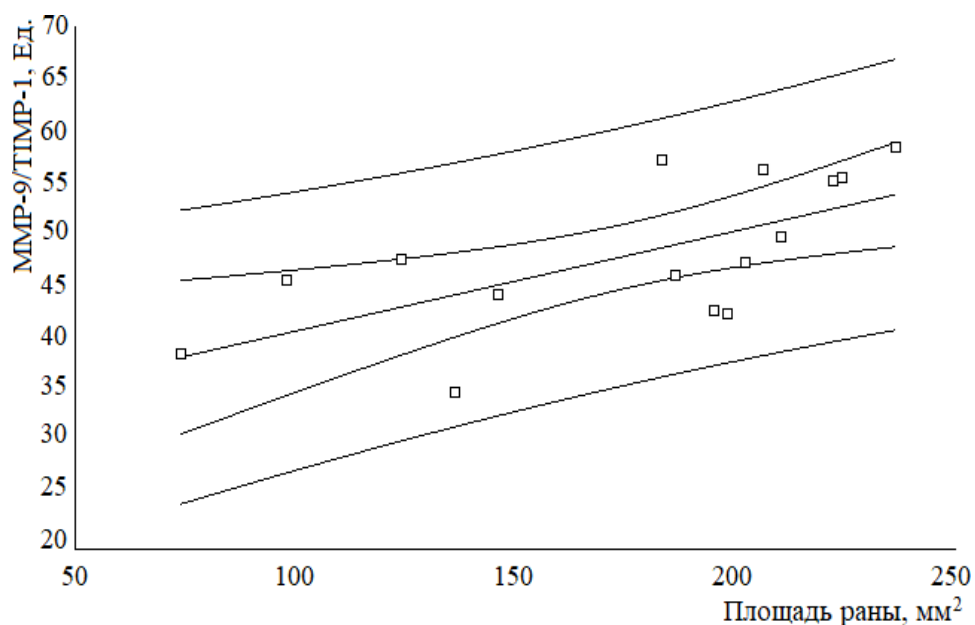


Рисунок 22 – График корреляции уровней ММП-9/ТИМР-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и площади раневых дефектов у крыс опытной группы на 7 сутки эксперимента ( $r_s=0,66$ )

Статистически значимая корреляция между площадями ожоговых дефектов и ИОС в гомогенатах тканей во всех группах животных во все сроки наблюдения не обнаружена.

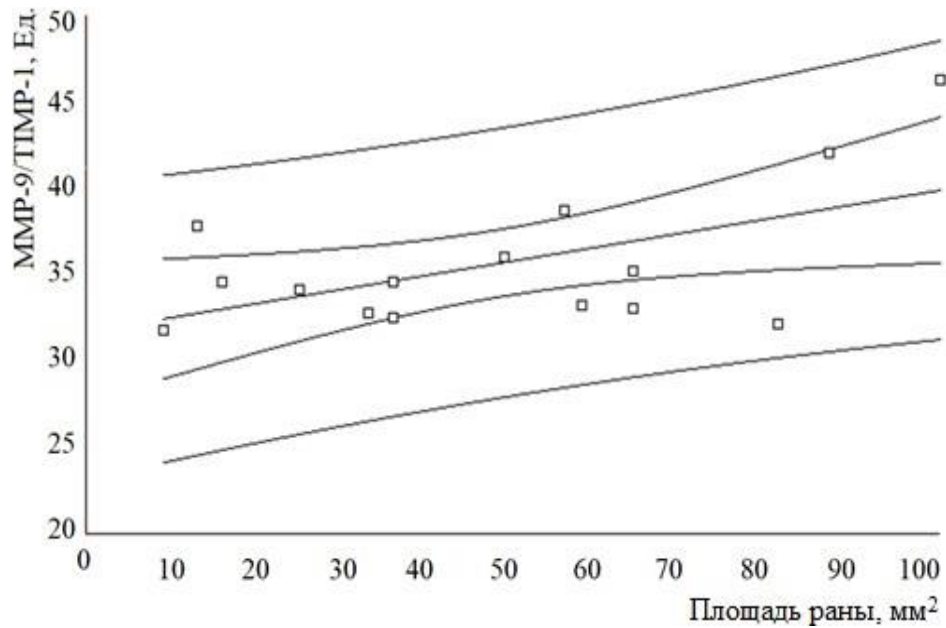


Рисунок 23 – График корреляции уровней ММР-9/ТИМР-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и площади раневых дефектов у крыс опытной группы на 14 сутки эксперимента ( $r_s=0,53$ )

**ГЛАВА 5**

**БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОРЕГЕНЕРАТОРНОГО**

**ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО**

**N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

(обсуждение результатов исследования)

Анализ результатов планиметрической оценки динамики заживления экспериментальных ожоговых ран кожи крыс показал несомненный прорегенераторный эффект 2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ, примененного в виде 2% мази. Этот факт подтверждается тем, что в группе животных, получающих аппликации мази, на всех этапах наблюдения средняя площадь ожогов была статистически значимо меньше (рисунок 24) и рубцевание раневых дефектов произошло достоверно быстрее, чем в обеих контрольных группах.

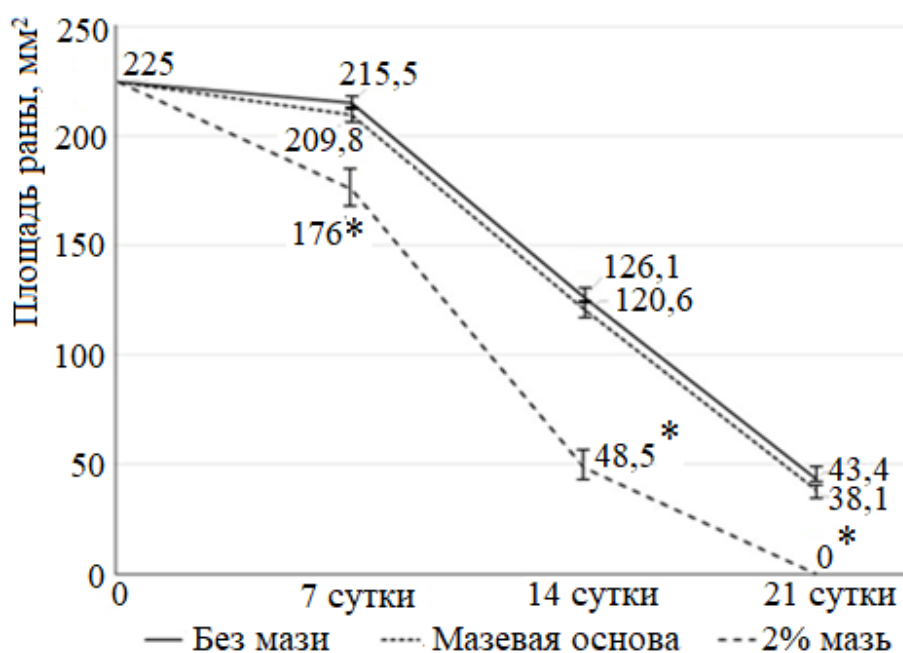


Рисунок 24 – Динамика сокращения площади дефектов кожи крыс при регенерации термического ожога.

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p < 0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2 в тот же срок наблюдения

Причем статистически значимых различий значений площади ожоговых ран между контрольными группами 1 и 2 на всех стадиях раневого процесса и сроках заживления не наблюдалось, это позволяет утверждать, что аппликация на ожоговые дефекты только мазевой основы не оказывает стимулирующего эффекта на регенерацию.

В стадию воспаления к 7 суткам эксперимента сокращение площади ожогов в опытной группе крыс составило 21,7%, а в 1 и 2 контрольных группах – соответственно 4,4% и 7,1% от их исходной величины. На 14 сутки наблюдения, в стадию пролиферации, площади ожоговых дефектов животных сократились относительно их исходной площади в опытной группе на 78%, а в 1 и 2 контрольных группах – на 44% и 47% соответственно. В опытной группе животных в среднем на 19-е ( $19,1 \pm 0,6$ ) сутки эксперимента наблюдалось отторжение струпа, тогда как в контрольных группах регистрировали наличие ран под струпом, площади которых сократились соответственно на 62% и 65% от их исходного размера. Отторжение струпа у животных контрольных групп 1 и 2 отмечали в среднем на 23-и ( $23,4 \pm 1,0$ ) и 22-е ( $22,1 \pm 0,9$ ) сутки эксперимента соответственно.

Регистрируемые более высокие темпы регенерации в опытной группе крыс с морфофизиологических позиций базируются на быстром купировании воспаления и отсутствии тенденции к распространению воспалительного инфильтрата в окружающие ткани. При этом процесс очищения раневого поля происходил более интенсивно, что способствовало ускоренной смене стадии воспаления следующей – пролиферации с образованием в области нанесенной травмы грануляционной ткани. Она является субстратом для роста регенерирующего эпителия, что приводит к достаточно быстрому сокращению площади кожного дефекта. Судя по скорости уменьшения площади ожогов у животных обеих контрольных групп, эти процессы были не столь активными.

Известно, что морфофункциональные изменения в тканях обусловлены биохимическими процессами, протекающими в поврежденных структурах. В проведенном исследовании было изучено соотношение в крови и тканях из области раневых дефектов содержание веществ, обладающих оксидантными и антиоксидантными свойствами, соотношение которых характеризует

выраженность оксидативного стресса (ОС) – одного из типовых патологических процессов. В тех же исследуемых биоматериалах был определен уровень MMP-9, соотнесенный с содержанием TIMP-1, который специфически ингибирует действие данного фермента.

Сопоставляя динамику сокращения площадей раневых дефектов с изученными биохимическими показателями, можно проследить некоторые закономерности (таблица 21).

Таблица 21 – Площадь дефектов и биохимические показатели в гомогенатах тканей в динамике регенерации термического ожога кожи крыс [6]

Группы животных	Показатели		
	Площадь ожога, мм <sup>2</sup>	ИОС, ед.	MMP-9/TIMP-1, ед.
7 суток			
Контрольная 1	215,5±3,74	7,09±0,80	70,3±4,83
Контрольная 2	209,8±2,37	6,84±0,94	65,0±5,28
Опытная	176,0±12,62*	3,93±0,57*	48,2±1,84*
14 суток			
Контрольная 1	126,1±3,50	5,96±0,83	78,9±3,24
Контрольная 2	120,6±2,37	4,72±0,52	72,5±2,20
Опытная	48,5±6,71*#	2,75±0,26*#	35,7±1,05*#
21 сутки			
Контрольная 1	43,3±5,49#	0,92±0,04#	49,0±0,84#
Контрольная 2	38,1±5,01#	0,86±0,07#	46,8±1,96#
Опытная	0 (рубец)* #	0,66±0,05*#	22,5±0,70*#

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p<0,05$ ) между показателями у животных опытной группы и 1 и 2 контрольных групп, # – различие статистически значимо ( $p<0,05$ ) между соответствующими показателями у животных группы по сравнению с предыдущим сроком эксперимента.

По мере заживления ожогов во всех обследованных группах наблюдалось уменьшение выраженности ОС и соотношения MMP-9/TIMP-1, но в разной степени, в зависимости от вида воздействия на зону экспериментального ожога.



Индекс ОС, как в гомогенатах регенерирующих тканей, так и в крови животных опытной группы, получавших местную обработку ран 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, во все сроки наблюдения был достоверно ниже, чем в обеих контрольных группах, между которыми различия по данному показателю были статистически не значимыми (рисунки 25 и 26).

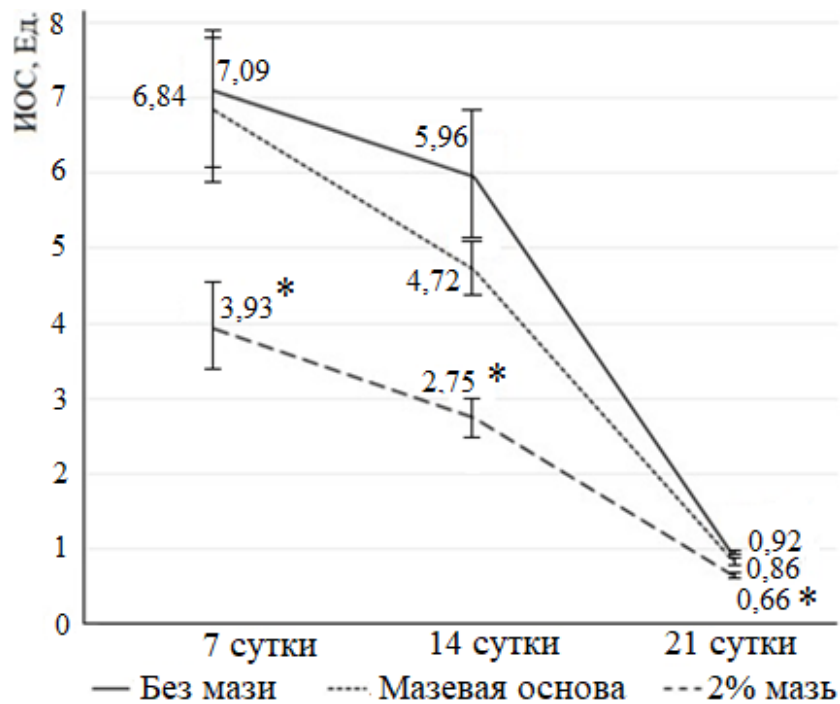


Рисунок 25 – Динамика индекса ОС в гомогенатах регенерирующих тканей при аппликациях экспериментальных термических ожогов крыс 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p < 0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2 в тот же срок наблюдения.

На 7 сутки наблюдения, в стадию воспаления, значение ИОС в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови крыс опытной группы было ниже соответственно на 44,6% и 15,7%, чем в 1 контрольной группе животных со спонтанным заживлением экспериментальных ожогов.

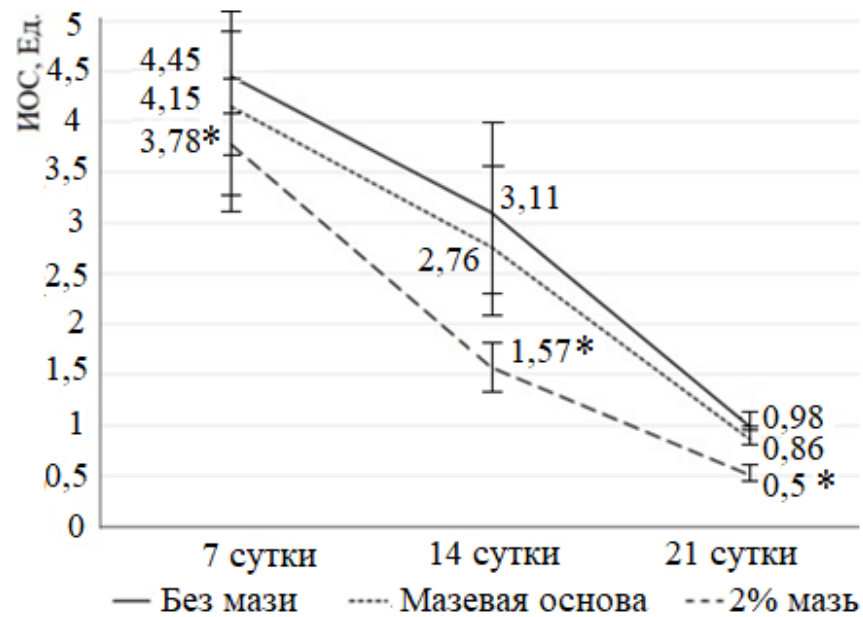


Рисунок 26 – Динамика индекса ОС в сыворотке крови крыс при аппликациях экспериментальных термических ожогов 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A- 6-АГ

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p < 0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и в тот же срок наблюдения.

На 14 сутки эксперимента, в стадию пролиферации, значение ИОС у крыс опытной группы по сравнению с 1 контрольной группой было ниже на 53,8% и 49,5% в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови соответственно. Сравнение значений ИОС в этот срок наблюдения с таковыми на предыдущей неделе выявило достоверное различие только у животных опытной группы, но не контрольных. Так, снижение значения ИОС в опытной группе крыс на 14 сутки эксперимента по сравнению со значениями на 7 сутки составило 30,0% и 58,5% соответственно в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови.

В стадию эпителизации, на 21 сутки наблюдения, в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови животных опытной группы значение ИОС по сравнению с 1 контрольной группой было ниже на 28,3% и 48,9% соответственно.

Сравнение значений ИОС на 21 сутки эксперимента по сравнению с таковыми на предыдущей неделе показало достоверное различие у всех групп

животных. Так, снижение значений ИОС в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови в этот срок наблюдения по сравнению с значениями на 14 сутки у опытной группы крыс составило 76,0% и 68,1%, у контрольной группы 2 – 81,8% и 68,8%, у контрольной группы 1 – 84,6% и 68,5% соответственно.

На момент завершения эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови всех крыс количество антиоксидантов превышает количество оксидантов, причем у животных опытной группы примерно в 2 раза. Учитывая данные научной литературы о показателях ОС в тканях и крови [113, 138, 216], а также собственные результаты о значении ИОС в крови для интактных крыс, можно говорить о восстановлении баланса веществ, обладающих оксидантными и антиоксидантными свойствами, то есть отсутствии оксидативного стресса.

Принимая во внимание, что выраженность ОС отражает дисбаланс соотношения в биоматериале веществ с оксидантными и антиоксидантными свойствами, очевидно, что выявленная в исследовании динамика индекса ОС в процессе регенерации ожоговых ран кожи сопровождается снижением содержания первых и увеличением вторых во всех обследованных группах. Однако у животных опытной группы, получавших обработку ран мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, по сравнению с контрольными группами устранение данного дисбаланса происходит интенсивнее на всех этапах восстановительного процесса в коже. Логично предположить, что восстановление баланса оксидантов–антиоксидантов в проведенном эксперименте связано с ослаблением воспалительной реакции и нормализацией кровообращения в тканях, причем у животных опытной группы в большей степени и в более ранние сроки.

Процесс заживления ожоговых ран во всех обследованных группах сопровождался уменьшением не только активности ОС, но и соотношения MMP-9 и TIMP-1. Выраженность данной тенденции проявлялась в разной степени и зависела от вида воздействия на зону экспериментального ожога.

Соотношение уровней MMP-9 и TIMP-1 как в гомогенатах

регенерирующих тканей, так и в крови крыс, получавших местные аппликации ожоговых ран 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, во все сроки эксперимента было достоверно ниже, чем в обеих контрольных группах, между которыми различия по данному показателю были статистически не значимыми (рисунки 27 и 28).

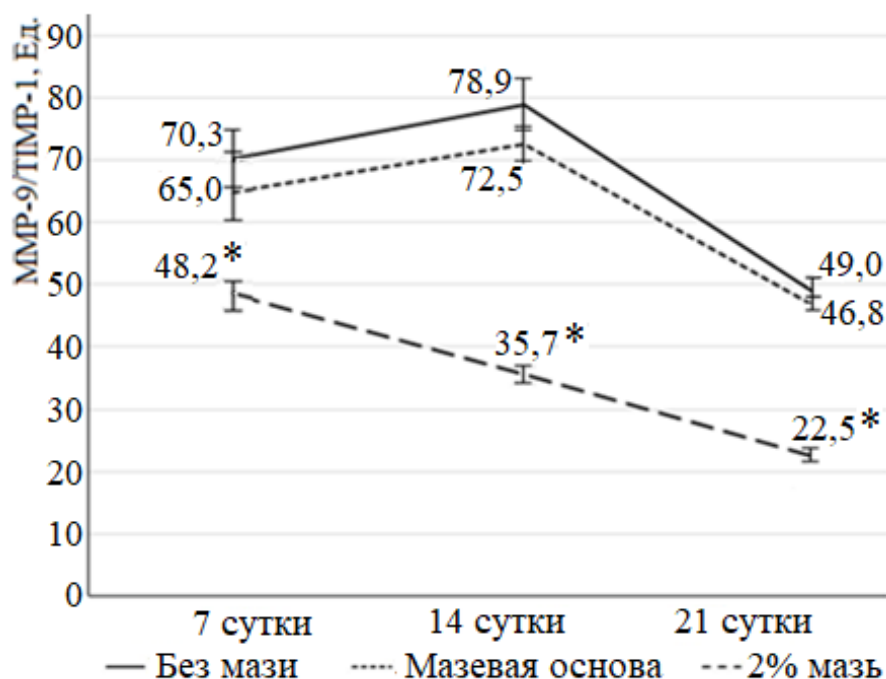


Рисунок 27 – Динамика MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей при аппликациях экспериментальных термических ожогов крыс 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p < 0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2 в тот же срок наблюдения.

В стадию воспаления (на 7 сутки наблюдения) значение MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови крыс опытной группы было ниже соответственно на 31,4% и 47,9%, чем в контрольной группе животных со спонтанным заживлением экспериментальных ожогов.

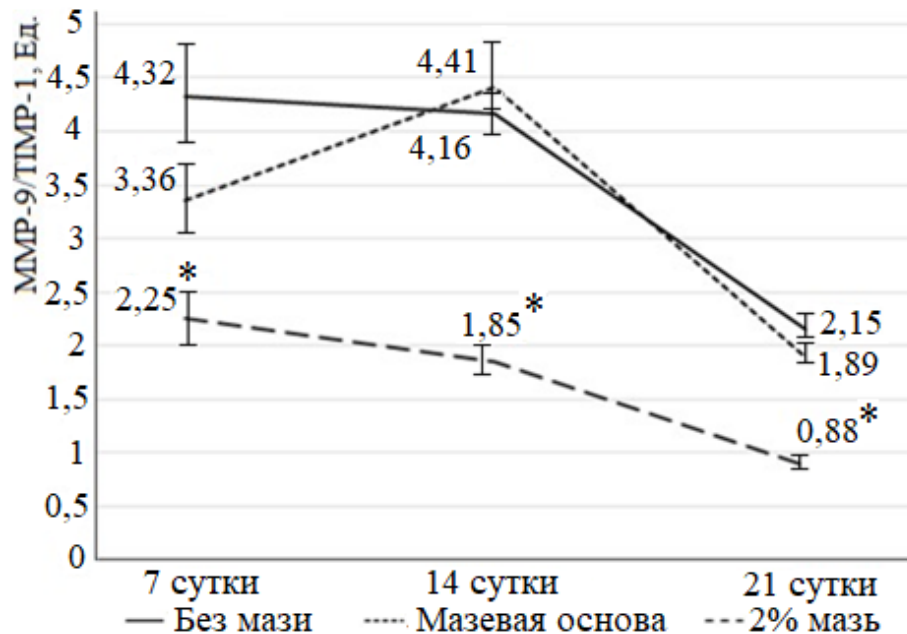


Рисунок 28 – Динамика ММР-9/ТИМР-1 в сыворотке крови крыс при аппликациях экспериментальных термических ожогов 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ

Примечание: \* – различие статистически значимо ( $p < 0,05$ ) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2 в тот же срок наблюдения.

На второй неделе эксперимента, в стадию пролиферации, значение ММР-9/ТИМР-1 у крыс опытной группы по сравнению с контрольной группой 1 было ниже на 54,6% и 55,5% соответственно в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови. Обращает на себя внимание, тот факт, что в контрольных группах наблюдалось повышение значений ММР-9/ТИМР-1 в обоих исследованных биоматериалах по сравнению со значениями на предыдущей неделе, хотя и статистически не значимое, тогда как у животных опытной группы за данный период произошло достоверное снижение индекса ММР-9/ТИМР-1. Так, снижение значения данного показателя в опытной группе крыс на 14 сутки эксперимента по сравнению с соответствующими значениями на 7 сутки было достоверным и составило 25,9% и 17,8% в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови соответственно.

На третьей неделе эксперимента, в стадию эпителизации, в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови животных опытной группы значение ММР-9/ТИМР-1 у крыс опытной группы по сравнению с контрольной

группой 1 было ниже на 54,1% и 59,1% соответственно. Значения MMP-9/TIMP-1 как в гомогенатах регенерирующих тканей, так и в крови, в данный срок наблюдения по сравнению с таковыми на предыдущей неделе были достоверно ниже у всех групп животных. Так, снижение значений MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови в этот срок наблюдения по сравнению со значениями на 14 сутки у опытной группы крыс составило 37,0% и 52,4%, у контрольной группы 2 – 35,4% и 57,1%, у контрольной группы 1 – 37,9% и 48,3% соответственно.

Согласно данным научной литературы MMP-9 является важным участником процесса регенерации кожных ран, поскольку она существенно тормозится как при отсутствии MMP-9 у генетически модифицированных по этому гену (knock-out) мышей [155, 167], так и при избытке этого фермента в тканях [221]. Следовательно, для оптимального протекания регенерации ран кожи необходим определенный уровень фермента в тканях, который достигается как регуляцией экспрессии фермента, его посттранскрипционных модификаций, так и связыванием специфическими тканевыми ингибиторами, в первую очередь, TIMP-1 [131].

Изучение динамики содержания MMP-9/TIMP-1 в фазу воспаления показало наличие существенно повышенных уровней протеолитического фермента как в регенерирующих тканях, так и в крови экспериментальных животных. Основным источником MMP-9 в эту фазу являются многочисленные нейтрофилы и макрофаги, инфильтрирующие зону воспаления [143]. На первой неделе эксперимента уровни MMP-9/TIMP-1 были в значительно повышены у животных всех групп, однако в группе крыс, получавших курс аппликаций раневых дефектов кожи мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, данное соотношение в гомогенатах регенерирующих тканей было в 1,5 раза, а в крови в 2 раза ниже, чем в контрольных группах.

Обнаруженное на 14 день эксперимента (фаза пролиферации) повышение значения MMP-9/TIMP-1 в обеих контрольных группах свидетельствует о продолжающемся воспалении в тканях и неблагоприятном течении процесса репарации кожи. В опытной группе животных в этот период наблюдения на

фоне статистически значимо ускоренного сокращения площади ожоговых ран по сравнению с контрольными группами происходило достоверное снижение уровня ММР-9/ТИМР-1, связанное, в основном, со снижением концентрации фермента, продуцируемого макрофагами и фибробластами, очевидно, в связи с уменьшением воспалительной инфильтрации тканей области ожога и пролиферации клеток грануляционной ткани.

На 21 сутки эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови всех крыс значение ММР-9/ТИМР-1 достоверно снизилось по сравнению с предыдущей неделей эксперимента за счет, как снижения уровня фермента, так и повышения концентрации ингибитора. При этом у всех животных контрольных групп еще присутствовали раневые дефекты кожи под струпом, тогда как у всех животных опытной группы произошло их заживление в среднем на  $19,1 \pm 0,6$  сутки. Учитывая изложенное выше, можно полагать, что значения ММР-9/ТИМР-1 в гомогенатах тканей –  $22,5 \pm 0,70$ , а в сыворотке крови –  $0,88 \pm 0,08$  являются оптимальными для успешного протекания репарации раневых дефектов кожи, что согласуется с данными научной литературы о показателях в тканях и крови [85, 122, 208], а также подтверждается собственными результатами о значении ММР-9/ТИМР-1 в крови для интактных крыс.

Как было указано в главе «Материалы и методы», при однократной аппликации 2 грамм 2% мази на раны наносилось 40 мг 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, что с учетом массы крыс 180-200 г, составляет 200-222 мкг/кг. Учитывая данные научной литературы [48] о значении показателя острой токсичности (LD50) N-A-6-АГ кислоты и ее производных – 1234-2558 мг/кг, применяемая в данном исследовании однократная доза действующего вещества является нетоксичной. Результаты, полученные с помощью разработанной в данном исследовании методики количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии, показали, что концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и N-A-6-АГ кислоты в плазме крови крыс через 2 часа после однократного нанесения 2 грамм мази составили  $18,05 \pm 0,96$  нг/мл и  $21,62 \pm 1,12$  нг/мл соответственно в пересчете на 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ. Эти

данные, свидетельствуют о незначительной резорбции 2-Э-6-М-3-ГПН-А-6-АГ через поверхность ожогового дефекта и позволяют утверждать, что его прорегенераторная активность и ассоциированные с репарацией обнаруженные изменения биохимических показателей, обусловлены местным действием нового производного N-А-6-АГ кислоты.

Результаты проведенного корреляционного анализа между изученными биохимическими маркерами и площадями ожоговых ран показали, что только у крыс опытной группы в гомогенатах тканей из области ожогов, полученных на 7 и 14 сутки эксперимента, имеется взаимосвязь средней силы между ИОС и MMP-9/TIMP-1, а также между площадями термических дефектов (S) и MMP-9/TIMP-1. Статистически значимая корреляция в отношении S и ИОС в гомогенатах тканей во всех группах животных и во все сроки наблюдения не обнаружена.

Учитывая патогенез раневого процесса и причинно-следственные связи между его факторами можно предложить следующую логическую цепочку взаимосвязи изученных в данном исследовании параметров [6]. Термическое воздействие вызывает повреждение эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки, формируя раневой дефект, при этом развивается местное воспаление. Стандартным типовым патологическим процессом в фазу воспаления является оксидативный стресс, в отношении которого и протеолитической активности MMP-9 (MMP-9/TIMP-1) в гомогенатах тканей крыс опытной группы обнаружена корреляции средней силы. В свою очередь, в данной группе животных между уровнем MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах тканей и площадями раневых дефектов также выявлена корреляция средней силы, свидетельствующая о том, что площадь заживающего ожога зависит, в том числе, от соотношения MMP-9 и TIMP-1, характеризующего активность MMP-9.



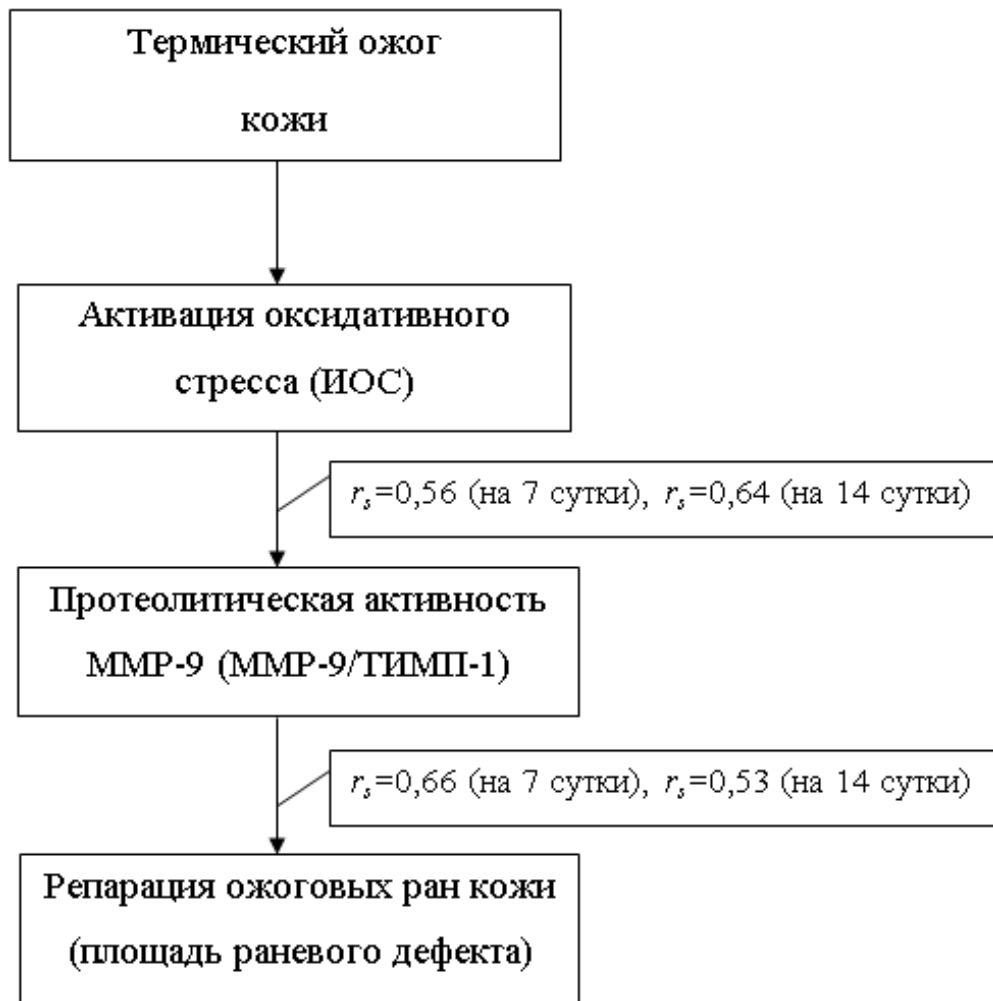


Рисунок 29 – Влияние биохимических показателей в регенерирующих тканях на репарацию термических ожогов кожи у крыс, получавших курс аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ ( $r_s$  – ранговый коэффициент корреляции Спирмена)

Подобная ситуация (влияние ОС и протеолитической активности ММР-9) наблюдается и на стадии пролиферации, но исчезает на последней стадии раневого процесса – эпителизации.

Предложенная схема (рисунок 29) влияния ОС на продукцию ММР-9 и, в свою очередь, воздействие последней на процесс заживления ран кожи, представляется логичной, поскольку, именно, на стадии пролиферации раневого процесса преимущественно происходят процессы морфогенеза тканей кожи.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование подтвердило у нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ) наличие прорегенераторного потенциала, который реализуется местно при его использовании в виде 2% мази для курса аппликаций на экспериментальные термические ожоги кожи у крыс уже на стадиях воспаления и пролиферации. Прорегенераторные свойства исследуемого вещества проявились в достоверном ускорении заживления ожоговых ран кожи. Так, рубцевание раневых дефектов кожи в группе животных, получавших аппликации мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, произошло в среднем на 3,5 суток раньше, чем у крыс с обработкой ран мазевой основой и со спонтанным заживлением ран.

Результаты изучения динамики в гомогенатах регенерирующих тканей и крови уровней общей оксидантной и антиоксидантной активности, а также матриксной металлопротеиназы 9 типа и тканевого ингибитора 1 типа, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что репарация термических ожогов при местном лечении мазью, содержащей 2% нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, протекает на фоне нормализации свободнорадикальных процессов и протеолитической активностей в тканях.

Проведенный корреляционный анализ показал у животных, получавших на ожоговые раны аппликации мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, наличие достоверной взаимосвязи между уровнями ИОС и MMP-9/TIMP-1, а также между уровнем MMP-9/TIMP-1 и площадью раневых дефектов в фазы воспаления и пролиферации процесса регенерации.

## ВЫВОДЫ

1. Площади ожоговых ран кожи крыс, получавших курс аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, на 7, 14 и 21 сутки эксперимента были достоверно меньше, чем в контрольных группах.

2. Результаты местного применения для обработки термических ожогов кожи крыс 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ продемонстрировали наличие у нее прорегенераторных свойств. Полное заживление ожоговых ран у крыс, получавших курс аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, произошло раньше, чем у животных контрольных групп в среднем на 3,5 суток.

3. Прорегенераторная активность 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ ассоциирована со снижением выраженности оксидативного стресса в гомогенатах регенерирующих тканей, а именно, значения ИОС на всех этапах эксперимента были достоверно ниже в сравнении с животными контрольных групп.

4. Стимулирующий репаративный эффект 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ ассоциирован со статистически значимым снижением протеолитической активности MMP-9 и коэффициента MMP-9/TIMP-1 на всех этапах эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей.

5. Концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и N-A-6-АГ кислоты в плазме крови крыс через 2 часа после однократного нанесения 2 грамм мази составили  $18,05 \pm 0,96$  нг/мл и  $21,62 \pm 1,12$  нг/мл соответственно в пересчете на 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ согласно разработанной в данном исследовании методики количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Незначительная резорбция этого вещества через поверхность ожогового дефекта свидетельствует о том, что прорегенераторная активность нового производного N-A-6-АГ кислоты и ассоциированные с репарацией обнаруженные изменения биохимических показателей обусловлены местным действием вещества на регенерирующие ткани.

6. У животных, получавших на ожоговые раны курс аппликаций 2% мастью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, выявлено наличие достоверной корреляционной связи средней силы между уровнями ИОС и ММР-9/ТИМР-1, а также между уровнем ММР-9/ТИМР-1 и площадью раневых дефектов в фазы воспаления и пролиферации.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки и прогнозирования эффективности репарации ожоговых ран кожи у крыс целесообразно использовать биохимические показатели – ИОС и ММР-9/ТИМР-1.

2. При изучении эффективности репарации ожоговых ран кожи у крыс следует считать оптимальными для успешного протекания процесса значения ИОС и ММР-9/ТИМР-1 в гомогенатах тканей –  $0,66 \pm 0,05$  и  $22,5 \pm 0,70$ , а в сыворотке крови –  $0,50 \pm 0,08$  и  $0,88 \pm 0,08$ .

3. Целесообразно провести доклинические исследования местного применения курса аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ на раны кожи животных для решения вопроса о клинических испытаниях с целью терапевтического применения данной мази.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АК – ацексамовая кислота

АО – антиоксиданты

АОС – антиоксидантная система

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФК – активные формы кислорода

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИОС – индекс оксидативного стресса

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МКБ-10 – международная классификация болезней-10

мЛПНП – модифицированные липопротеины низкой плотности

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФН+Н<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотидфосфат в восстановленной форме

ОС – окислительный стресс

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

СК – синглетный кислород

СОД – супероксиддисмутаза

ТМБ – тетраметилбензидин

ФДТ – фотодинамическая терапия

ЦП – церуллоплазмин

ЦПЭ – цепь переноса электронов

2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат

АОРР – advanced oxidation protein product

DNA – deoxyribonucleic acid

Cu/ZnSOD – Cu/Zn-superoxidedismutase

IL-1 $\beta$  – interleukin-1 beta

GSH – glutathione

GSSG – glutathione disulfide

LD50 – median lethal dose

LDL – low-density lipoprotein

LPO – lipoperoxide

MMP – matrix metalloproteinase

MRM – multiple reaction monitoring

N-A-6-АГ – N-ацетил-6-аминогексановая кислота

TAS – total antioxidant status

TIMP – tissue inhibitors of metalloproteinases

TOS – total oxidant status

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абаленихина, Ю.В. Пероксинитрит: токсический агент и сигнальная молекула (обзор) [Текст] / Ю.В. Абаленихина, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Том 56, № 6. – С. 523-535.
2. Аксенов, А.И. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца [Текст] / А. И. Аксенов, О. С. Полунина, Е. И. Мясоедова // Забайкальский медицинский вестник. – 2016. – №3. – С. 64-69.
3. Алексеев, А.А. Принципы организации и оказания медицинской помощи пострадавшим от ожогов [Текст] / А. А. Алексеев, С. В. Попов // Сборник тезисов конференции: «Актуальные вопросы лечения термической травмы». – 2016. – № 55. – С. 13-14.
4. Алексеева, Н.Т. Морфологические особенности раневого процесса в коже при региональном лечебном воздействии: автореф. дис. доктора мед. наук: 03.03.04 / Алексеева Наталья Тимофеевна. – Оренбург, 2015. – 41 с.
5. Андрианова, Е.В. Динамика показателей оксидативного стресса и планиметрическая оценка ожоговых ран при лечении новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты [Текст] / Е.В. Андрианова, М.А. Петровская, М.Б. Петрова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 3. – С.1-8; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=29741> (дата обращения: 30.04.2022).
6. Андрианова, Е.В. Биохимические аспекты прорегенераторного действия 2-этил-6-метил-3- гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата [Текст] / Е.В. Андрианова, Е.Н. Егорова, М.Б. Петрова, М.А. Пахомов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2021. – № 1. – С. 12-16.
7. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине [Текст] / С. А. Шахмарданова, О.Н.



Гулевская, В.В. Селецкая [и др.] // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2016. – №3. – С. 4-15.

8. Ассоциация полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ с клиническими проявлениями бронхиальной астмы у детей. [Текст] / А. А. Лебедеенко, Т. П. Шкурят, Е. В. Машкина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2018. – 20(6). – С. 905-912.

9. Ацефин – в комплексном лечении заболеваний пародонта [Текст] / О. В. Ключников, В. М. Галченко, Ю. М. Подкорытов, О. Н. Ключникова // Роль и значение науки и техники для развития современного общества. - Волгоград: «МЦИИ ОМЕГА САЙНС». – 2018. – Ч. 4. – С. 115-116.

10. Бердникова, О. С. Воздействие гипоксии и среды высоких концентраций CO<sub>2</sub> на образование активных форм кислорода в клетках различных по устойчивости растений: дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.04 / Бердникова Ольга Сергеевна. – Воронеж. – 2016. – 162 стр.

11. Биоантиоксиданты (часть 1) [Текст] / С. В. Гудков, В. И. Брусков, А. В. Куликов [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2014. – №31. – С.61-65.

12. Биоантиоксиданты (часть 2) [Текст] / С. В. Гудков, В. И. Брусков, А. В. Куликов [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2014. – №31. – С.65-69.

13. Биохимия : учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. И доп. – М. : Гэотар-мед., 2019. – 768 с.

14. Бондарь, И. А. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы в развитии фиброза почек при сахарном диабете [Текст] / И. А. Бондарь, В. В. Климонтов // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 1. – С. 39-44.

15. Броди, С. А. Мужское бесплодие и окислительный стресс: роль диеты, образа жизни и пищевых добавок [Текст] / С. А. Броди // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – Вып.3. – С. 33-40.

16. Бутрин, Я. Л. Лечебно-эвакуационная характеристика пострадавших с глубокими ожогами лица: дисс. ... канд. мед. наук : 14.01.17 / Бутрин Ярослав

Любомирович. – СПб. – 2019. – 147 с.

17. Влияние ацексамовой кислоты на процесс репаративной регенерации трубчатой кости в эксперименте [Текст] / М. Б. Петрова, Е. А. Харитоновна, В. Г. Шестакова [и др.] // Журнал теоретической и практической медицины. – 2011. – Т. 9. – С. 218-220.

18. Воробьева, Н. В. NADPH-оксидаза нейтрофилов и заболевания, связанные с ее дисфункцией [Текст] / Н. В. Воробьева // Иммунология. – 2013. – № 4. – С. 228-232.

19. Воронина, Т. А. Мексидол: Основные нейрорепаративные эффекты и механизм действия [Текст] / Т. А. Воронина // Фарматека. – 2009. – № 6 (180). – С. 35-38.

20. Гаврилова, О. А. Особенности процесса перекисного окисления липидов в норме и при некоторых патологических состояниях у детей (обзор литературы) [Текст] / О. А. Гаврилова // Acta biomedica scientifica. – 2017. – Том 2, №4. – С. 15-22.

21. Гладких, Н. Н. Матриксные металлопротеиназы в ранней диагностике остеохондроза позвоночника при врожденной дисплазии соединительной ткани [Текст] / Н. Н. Гладких, А. В. Ягода, М. Б. Джазаева // Врач. – 2019.

– Том 30, №3. – С. 21-24.

22. Губский, Ю. И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография [Текст] / Ю. И. Губский. – Винница: Новая Книга, 2015.

– 360 с.

23. Демьяненко, И. А. Морфологическая характеристика репаративных процессов в коже при действии митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Демьяненко Илья Александрович. – М. – 2012. – 22 с.

24. Денисова, В. М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия [Текст] / В. М. Денисова, А. С. Молотков, М. И. Ярмолинская // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Том LXI, Вып. 1. – С. 113-125.

25. Динамика матриксных металлопротеиназ при местной холодовой травме [Текст] / М. И. Михайличенко, К. Г. Шаповалов, В. А. Мудров, О. С. Груздева // Acta Biomedica Scientifica. – 2019. – 4(5). – С. 79-83.

26. Динамика травматизма среди взрослого населения Российской Федерации [Электронный ресурс] / С. П. Миронов, Н. А. Еськин, Т. М. Андреева [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им Н.Н. Приорова. – 2019. – (3):5-13. - Режим доступа: <https://doi.org/10.17116/vto20190315>.

27. Доказательные аспекты стимулирования заживления неосложненной раны при локальном применении серебряной соли ацексамовой кислоты [Текст] / Д. В. Пахомов, Е. В. Блинова, Д. Н. Шимановский [и др.] // Оперативная хирургия и клиническая анатомия. – 2020. – Т.4, № 1. – С. 19- 25.

28. Донцов, В. И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении [Текст] / В. И. Донцов // Труды ИСЫ РАН. – 2006. – Т.19. – С. 50-69.

29. Ермакович, А. С. Влияние липосом с альфа-токоферолом на показатели системы оксиданты/антиоксиданты в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии [Текст] / А. С. Ермакович // Сборник материалов LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых. - Белорусский ГМУ. – 2017. – С.179-184.

30. Ефимов Е.А. Посттравматическая регенерация кожи (экспериментальное исследование). – М.: Медицина, 1975. – 167 с.

31. Жигулина, В. В. Матриксные металлопротеиназы при парадонтите [Текст] / В. В. Жигулина, В. А. Румянцев // Вестник ТвГУ, сер. "Химия". – 2016. – № 3. – С. 134-144.

32. Жидкова, Ю. Ю., Предпосылки к совершенствованию фармако-профилактики гипертрофических и келоидных рубцов [Текст] / Ю. Ю. Жидкова, Н. А. Пенъевская, Э. Ф. Степанова Э.Ф. // Научные ведомости, сер. Медицина. Фармация. – 2012. – №10 (129), Вып. 18/3. – С. 5-10.

33. Замотаева, М. Н. Влияние мексидола на морфологическую картину миокарда при острой сердечной недостаточности в эксперименте [Текст] / Е.

А. Лузина, А. В. Бренчагов, Е. Н. Зайцева [и др.] // Материалы Международной (заочной) научно-практической конференции: «Новая наука: современное состояние и перспективы развития». – 2019. – С. 288-294.

34. Земцова, А. Я. А-, β-, γ-, δ-токоферолы семени облепихи (*Hipporhae Rhamnoides* L.) в условиях лесостепи Алтайского края [Текст] / А. Я. Земцова, Ю. А. Зубарев // Материалы IV (VI) Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных ученых: «Перспективы развития и проблемы современной ботаники». – 2018. – С. 80-83.

35. Исследование матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных с новообразованиями яичников [Текст] / К. П. Лактионов, Н. В. Лёвкина, Д. Н. Кушлинский, Е. С. Герштейн // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2012. – № 2. – С. 48-54.

36. Карбышев, М. С. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие [Текст] / М. С. Карбышев, Ш. П. Абдуллаев; под. ред. А. В. Шестопалова. – Москва. – 2018. – 60 с.

37. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии [Текст] / А. С. Шадрина, Я. З. Плиева, Д. Н. Кушлинский [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2017. – 45 (4). – С. 266-279.

38. Кормош, Н. Г. Физиологическая роль активных форм кислорода на клеточном уровне и организма в целом – взгляд клинициста. Ч.2. [Текст] / Н. Г. Кормош // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Том 11, №1. – С. 85-90.

39. Короткова, Е. А. Клинические перспективы исследования матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных раком толстой кишки [Текст] / Е. А. Короткова, Е. С. Герштейн, В. В. Пророков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – №10. – С. 41-46.

40. Котович, И. Л. Коррекция оксидантно-антиоксидантного баланса в лёгких при гипероксии с использованием липосомных форм альфатокоферола

и ретиноидов в эксперименте [Текст] / И. Л. Котович, Ж. А. Рутковская, А. Д. Таганович // Биомедицинская химия. – 2017. – 63 (4). – С. 289- 895.

41. Кремлева, Л. В. Модифицированные липопротеины низкой плотности: атерогенная и провоспалительная активность, роль в патогенезе острых коронарных синдромов. [Текст] / Л. В. Кремлева, С. В. Шалаев // Российский кардиологический журнал. – 2004. – Т. 46, № 2. – С. 70-75.

42. Курилов, И.Н. Возрастные особенности репаративного процесса в коже и костной ткани (экспериментальное исследование): автореф. дисс. ... доктора мед. наук: 14.01.30 / Курилов Игорь Николаевич. – СПб. – 2010. – 51 с.

43. Кушлинский, Н.Е. Матриксные металлопротеиназы и компоненты системы активации плазминогена в патогенезе и клиническом течении рака толстой кишки [Текст] / Н. Е. Кушлинский, Е. С. Герштейн // Патогенез. – 2013. – Том 11, №3. – С. 4-12.

44. Лавров, В.А. Молекулярные механизмы воспаления у обожженных [Электронный ресурс] / В. А. Лавров // Комбустиология. Электронный научный журнал. – 2005. – № 15.

45. Литвицкий, П.Ф. Клиническая патофизиология : учебник [Текст] / П.Ф. Литвицкий. – М.: Практическая медицина, 2017. – 776 с.

46. Мартусевич, А.А. Влияние синглетного кислорода на антиоксидантную активность плазмы крови *in vitro* и *in vivo* [Текст] / А. А. Мартусевич // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2014. – Том 1, №1. – С. 55-58.

47. Мартусевич, А.А. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы [Текст] / А. А. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.К. Марутсевич // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 2. – 2012. – С. 128-134.

48. Миронов, М.А. Токсикологическая характеристика оригинальных производных N-ацетил-6-аминогексановой кислоты [Текст] / М. А. Миронов, Е.В. Блинова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2018. – № 3 (47). – С. 25-32.

49. Михин, И.В. Ожоги и отморожения: учебно-методическое пособие.

[Текст] / И. В. Михин, Ю. В. Кухтенко. – Волгоград. – 2012. – 88 с.

50. Молекулярно-клеточные изменения при атеросклерозе [Текст] / В. А. Аладинский, Н. Г. Никифоров, А. В. Темченко [и др.] // Клиническая медицина. – 2015. – Т. 93, № 6. – С. 14-18.

51. Нагорная, Н. В. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки [Текст] / Н. В. Нагорная, Н. А. Четверик // Клінічні Лекції. – 2010. – 2(23). – С. 140-145.

52. Ненашева, О.Н. Сравнительная характеристика определения белка в биологических жидкостях [Текст] / О. Н. Ненашева, И. С. Абросимова // Сборник материалов V всероссийской (79-й итоговой) студенческой научной конференции: «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты. – 2011. – С. 227-228.

53. Несвижский, С.Н. Формулы по химии: справочный материал[Текст] / С. Н. Несвижский. – М.: Эксмо, 2012. – 256 с.

54. Николаев, А. А., Участие свободных радикалов в функции сперматозоидов [Текст] / А. А. Николаев, П. В. Логинов, Р. В. Ветошкин // Астраханский медицинский журнал. – 2014. – Том 9. – С. 23-29.

55. Омеляненко, Н. П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия): монография в 2 т. Т. 1 [Текст] / Н. П. Омеляненко, Л. И. Слуцкий; под ред. С. П. Миронова. – М.: Известия, 2009. – 378 с.

56. Оценка антиоксидантной активности 4-гидрокси-3,5- дитретбутил коричной кислоты, мексидола и тиоктовой кислоты на модели фокальной ишемии головного мозга [Текст] / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, Е. И. Хури, Ю. Е. [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2017. – Т 20, №2. – С. 48-52.

57. Оценка биодоступности этилтиазолиламида ацетиламиногексановой кислоты при внутрижелудочном введении кроликам [Текст] / А. С. Малыгин, Н. С. Попов, М. А. Демидова, С. Б. Марасанов // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2018. – № 1. – С. 56-63.

58. Парамонов, Б.А. Ожоги: Руководство для врачей [Текст] / Б. А.

Парамонов, Я. О. Порембский, В. Г. Яблонский. – Спб.: СпецЛит, 2000. – 480 с.

59. Патент 2664453 Российская Федерация, МПК А 61 К 31/4425, С 07 D 213/18, А 61 Р 25/22, А 61 Р 25/28. Производное 3-гидроксипиридина с анксиолитической и ноотропной активностью [Текст] / О. А. Богомоллова, М. А. Демидова, С. Я. Скачилова ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО

«Тверской государственной медицинский университет». – № 2017141094 ; заявл. 24.11.2017 ; опубл. 17.08.2018, Бюл. № 23. – 18 с. : ил.

60. Патент 2668966 Российская Федерация, МПК С 07 D 213/65, С 07 С 233/47, А 61 К 31/195, А 61 К 31/ 4412, А 61 Р 19/10. Комплексные соли ацексамовой кислоты, стимулирующие регенерацию костной ткани, ускоряющие процессы репаративного остеогенеза, стимулирующие минерализацию костной ткани при остеопорозе [Текст] / С. Я. Скачилова, Г. А. Ермакова, Е. В. [и др.] ; заявитель и патентообладатель «АО «Всероссийский научный центр по безопасности БАВ». – № 2018102872 ; заявл. 25.01.2018 ; опубл. 05.10.2018, Бюл. № 28. – 11 с. : ил.

61. Патент 2719912 Российская Федерация, МПК G 09 В 23/28. Способ забора крови у крыс из периферических вен хвоста [Текст] / Тимкин П. Д., Кропотова М. Е., Петренко Н. И. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия». – № 2019121113 ; заявл. 07.03.2019, Бюл. № 12. – 6 с. : ил.

62. Патент 2731175 Российская Федерация, МПК А 61 К 31/195, А 61 К 31/4412, А 61 К 47/00, А 61 К 9/06, А 61 Р 17/02. Мазь для лечения ожогов 1-3 степени [Текст] / Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В. [и др.]; заявитель и патентообладатель «АО «Всероссийский научный центр по безопасности БАВ». – № 2019131604 ; заявл. 08.10.2019 ; опубл. 31.08.2020, Бюл. № 25. – 10 с. : ил.

63. Пахомова, А. Е. Новый способ экспериментального моделирования термических ожогов кожи у лабораторных животных, отвечающий принципам Good Laboratory Practice (надлежащей лабораторной практики) [Электронный ресурс] / А. Е. Пахомова, Ю. В. Пахомова, Е. Е. Пахомова // Медицина и

образование в Сибири. – 2015. – Вып. № 3.

64. Петри А., Сэбин К. Наглядная статистика в медицине / Пер. с англ. В.П. Леонова. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 144 с.

65. Петрова, М. Б. Изучение регенерации тканей на биологических моделях и в клинике [Текст] / М. Б. Петрова, Г. В. Хомулло // Верхневолжский медицинский журнал. – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 45-48.

66. Пискарев, И. М. Оценка окислительной и антиоксидантной способности биологических субстратов по хемилюминесценции индуцированной реакцией Фентона [Текст] / И. М. Пискарев, И. П. Иванова // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8, №3. – С. 16-26.

67. Плешкова, Е. М. Окислительный стресс и его участие в развитии и течении болезней мочевой системы у детей [Текст] / Е. М. Плешкова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2014. – Т. 59, №5. – С. 9-14.

68. Попов, Н. С. Оценка острой токсичности нового аминокислотного производного тиadiaзола при внутрибрюшинном введении мышам / Н. С. Попов, М. А. Демидова // Верхневолжский медицинский журнал. – 2016. – Т. 15, вып. 1. – С. 9-12.

69. Попов, Н. С. Фармакологические эффекты нового аминокислотного производного тиadiaзола : специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» : дис. на соиск. уч. степ. канд. фарм. наук / Попов Никита Сергеевич ; Белгород. гос. нац. исслед. ун-т. – Тверь, 2018. – 150 с.

70. Попов, Н. С. Применение ВЭЖХ-МАСС-спектрометрии для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс [Текст] / Н. С. Попов, Е. Н. Егорова, М. Б. Петрова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – № 10. – С. 45-51.

71. Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний / Университетская комиссия по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных. –



Москва, 2015. – 42 с.

72. Прогностическое значение матриксных металлопротеиназ 2, 7, 8,9 и их тканевого ингибитора 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки [Текст] / Н. Е. Кушлинский, Е. С. Герштейн, А. А. Алферов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Том 168,

№11. – С. 619-623.

73. Пустовалова, Р. А. Иммуно-биохимические и морфофункциональные особенности заживления ран при применении препарата «Супер-лимф»: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Пустовалова Регина Александровна. – Купавна, 2009. – 22 с.

74. Раны и раневой процесс: учеб. пособие для интернов, ординаторов и практических врачей [Текст] / А. А. Завражнов, М. Ю. Гвоздев, В. А. Крутова, А. А. Ордокова; под ред. Кочубей В.В. – Краснодар, 2016. – 29 с.

75. Регуляция активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на фоне развития токсического гепатита и экзогенного действия липоевой кислоты [Электронный ресурс] / А. В. Макеева, М. В. Лущик, В. И. Болотских, Т. Н. Попова // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – №3. – С.140-145.

76. Римжа, М. И. Эпидемиологические особенности ожогов у взрослых и детей [Текст] / М. И. Римжа, О. Н. Петровская, О. Н. Ханенко, Л. В. Золотухина // Военная медицина. – 2018. – № 2. – С. 96-100.

77. Роль SH-групп, церулоплазмина и ионов  $Fe^{2+}$  в поддержании равновесия в системе оксиданты – антиоксиданты плазмы крови больных раком желудка [Текст] / Е. А. Карпенко, К. А. Кудрявцева, А. Н. Путятин, Н. М. Титова // XXI МНПК «Перспективы развития науки и образования». – 2017. – С. 104-107.

78. Роль окислительного стресса в патогенезе эпилепсии [Текст] / Л. В. Липатова, Е. Е. Дубинина, Д. В. [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – №1. – С. 11-16.

79. Рутковская, Ж. А. Использование липосом с  $\alpha$ -токоферолом для коррекции дисбаланса в системе оксиданты/антиоксиданты в легких

новорожденных морских свинок в условиях гипероксии. [Текст] / Ж. А. Рутковская, И. Л. Котович, А. Д. Таганович // Инновационные технологии в фармации. – Иркутск, 2016. – Вып. 3. – С. 340-343.

80. Современные принципы лечения гнойных ран: учеб. пособие для слушателей факультета подготовки врачей и ординаторов по специальности «Хирургия» [Текст] / С. Я. Ивануса, П. Н. Зубарев, Б. В. Рисман, О. А. Литвинов. – СПб.: «Онли-Пресс», 2017. – 36 с.

81. Соколова, Н. А. Страмбовская Н.Н. Ассоциация генных полиморфизмов матриксных металлопротеиназ 12, 20 и тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1 с острым инфарктом миокарда [Текст] / Н. А. Соколова, М. С. Даньшова, А. В. Говорин // ЭНИ Забайкальский медицинский вестник. – 2017. – №2. – С. 96-100.

82. Состояние микроциркуляции при лечении ожогов в условиях влажной среды [Текст] / Н. Н. Карякин, И. А. Клеменова, П. В. Перетягин, А. С. Лузан // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12. – С.1789-1791.

83. Спиридонова, Т. Г. Патогенетические аспекты лечения ожоговых ран [Текст] / Т. Г. Спиридонова // Русский медицинский журнал. – 2002. – №8. – С. 395.

84. Стволовые клетки и регенеративная медицина: Сборник статей [Текст] / А. Ю. Ефименко, П. И. Макаревич; под ред. В. А. Ткачука. – М.: МАКС Пресс, 2012. – 264 с.

85. Структурная реорганизация тканей сердца при экспериментальной патологии и коррекция ее фармакологическими препаратами [Текст] / Л. Г. Прошина, Л. В. Коваленко, Л. М. Шевцова [и др.] // Вестник Новгородского государственного университета. – 2016. – Т. 97, № 6. – С. 147-151.

86. Сыркашева, А. Г. Окислительный стресс. Антиоксидантная терапия при прегравидарной подготовке и/или при бесплодии [Текст] / А. Г. Сыркашева, О. Е. Коротченко // Репродуктивное здоровье и ВРТ. Медицинский совет. – 2017. – №13. – С. 150-157.

87. Термическая травма: учебно-методическое пособие. [Текст] / А. Г. Сонис, К. А. Филимонов, М. А. Безрукова, Д. Г. Алексеев. – Самара, 2019. – 132 с.

88. Ткачук, В.А. Физиологические механизмы обновления клеток и регенерации тканей [Электронный ресурс] / В.А. Ткачук // научный доклад на президеуме РАН, Москва, 2016. – Режим доступа: [http://www.ras.ru/news/news\\_release.aspx?ID=ca36faaa-3b4d-478d-8297-50297b0cb43a](http://www.ras.ru/news/news_release.aspx?ID=ca36faaa-3b4d-478d-8297-50297b0cb43a).

89. Тюзиков, И. А. Окислительный стресс как ключевой механизм старения: патофизиологические механизмы и SMART-диагностика [Текст] / И. А. Тюзиков // Вопросы диетологии. – 2017. – Том 7, №1. – С. 47-54.

90. Узбеков, М. Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях [Текст] / М. Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Том 24, №4. – С. 97-104.

91. Улучшение репаративной регенерации в хирургии [Текст] / Д. В. Плечева, В. П. Окроян, Т. Р. Ибрагимов [и др.] // Пермский медицинский журнал. – 2018. – Т. 35, № 3. – С. 32-38.

92. Хирургическая тактика лечения и реабилитация детей с укушенными ранами лица и шеи [Текст] / А. Е. Резникова, Л. В. Агеева, Г. М. Савицкая [и др.] // Московский центр детской челюстно-лицевой хирургии: 10 лет: результаты, итоги, выводы. – М. – 2002. – С. 137-142.

93. Хэмм, Р. Л. Раны. Диагностика и лечение : атлас-справочник [Текст] / Р. Л. Хэмм; пер. с англ.; под ред. В. А. Митиша, Ю. С. Пасхаловой // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 536 с.

94. Чанчаева, Е. А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека [Текст] / Е. А. Чанчаева // Экология человека. – 2013. – №07. – С. – 50-58.

95. Челомбитько, М. А. Роль активных форм кислорода в воспалении. Мини-обзор [Текст] / М. А. Челомбитько // Вестник Московского университета. – 2018. – Сер. 16. – Т.73, №4. – С. 242-246.

96. Шестакова, В. Г. Регенерация кожной раны в условиях стимулированного ангиогенеза (экспериментально-морфологическое исследование): автореф. дисс. ... доктора мед. наук: 03.03.04 / Шестакова Валерия Геннадьевна. – Тюмень, 2020. – 50 с.

97. Щепин, А.С. Время жизни синглетного кислорода в столкновительных комплексах  $O_2$  - $CO_2$  [Текст] / А. С. Щепин, С. А. Пешков, Т. С. Пешкова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2016. – №3(191). – С. 92-96.

98. Ярмолинская, М. И. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия [Текст] / М. И. Ярмолинская, А. С. Молотков, В. М. Денисова // Журнал акушерства и детских болезней. – 2012. – Т. LXI, Вып.1. – С. 113-125.

99. Ярцева, С. В. Состояние системы оксиданты-антиоксиданты у больных бронхиальной астмой, сочетанной с ожирением [Текст] / С. В. Ярцева // Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии. Сборник научных трудов. – 2018. – Выпуск 2 (146). – С. 63-68.

100.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  prevents renal oxidative damage via the PARP1/SIRT1/NOX4 pathway in Zucker diabetic fatty rats [Electronic resource] /

D. Wang, Y. Li, N. Wang, G. Luo [et al.] // Am J Physiol Endocrinol Metab. – 2019. Doi: 10.1152/ajpendo.00270.2019.

101. A Novel Matrix Metalloproteinase-9 Inhibitor, Prevents Cardiac Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats [Electronic resource] / J. Baohong, L. Defang, D. Yanping [et al.] // PLoS One. – 2013. – № 8(3):e59621. Doi: 10.1371/journal.pone.0059621.

102. Abouelghar, G. E. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations induced by sub-acute exposure to fipronil (COACH®) in albino mice and ameliorative effect of selenium plus vitamin E [Electronic resource] / G. E. Abouelghar, Z. A. El-Bermawy, H. M. S. Salman // Environ Sci Pollut Res Int. – 2019. Doi: 10.1007/s11356-019-06579-9.

103. Alpha-Tocopherol May Protect Hepatocytes Against Oxidative

Damage Induced by Endurance Training in Growing Organisms [Text] / M. Górnicka, M. Drywień, Frąckiewicz [and etc.] // *Adv Clin Exp Med.* – 2016. – № 25(4). – P. 673-679.

104. Anti-matrix metalloproteinase-9 DNzyme decreases tumor growth in the MMTV-PyMT mouse model of breast cancer [Electronic resource] / Miranda A Hallett, Bin Teng, Hisashi Hasegawa [and etc.]. // *Breast Cancer Res.* – 2013. – 15(1): R12. Doi: 10.1186/bcr3385

105. Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with renal ischemic reperfusion [Electronic resource] / Mozaffari Godarzi S, Valizade Gorji A [and etc.]. // *Nefrologia.* – 2019. – Pii: S0211-6995(19)30193-6. Doi: 10.1016/j.nefro.2019.10.003

106. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants [Text] / Michalina Grzesik, Katarzyna Naparło, Grzegorz Bartosz, Izabela Sadowska-Bartosz // *Food Chemistry.* – 2018. – Vol. 241, № 15. – P. 480-492.

107. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications [Text] / A. Raghunath, K. Sundarraj, R. Nagarajan, F. Arfuso. // *Redox Biology.* – 2018. – Vol 17. – P. 297-314.

108. Autophagy in Female Fertility: A Role in Oxidative Stress and Aging [Electronic resource] / Peters AE, Mihalas BP, Bromfield EG [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2019. Doi: 10.1089/ars.2019.7986.

109. Bronchoscopic delivery of aminocaproic acid as a treatment for pulmonary bleeding: A case series [Electronic resource] / R. P. Simon, C. Oromendia, L. M. Sanso [et al.] // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2019. – № 60:101871. Doi: 10.1016/j.pupt.2019.101871.

110. Cellular Oxidative Stress in Pediatric Leukemia and Lymphoma Patients Undergoing Treatment Is Associated with Protein Consumption [Electronic resource] / Raber M, Wu J, Donnella H [et al.] // *Nutrients.* – 2019. – № 27;12(1). – Pii: E75. Doi: 10.3390/nu12010075.

111. Cervini-Silva, J. Oxidative stress inhibition and oxidant activity by

fibrous clays [Text] / J. Cervini-Silva, A. Nieto-Camacho, V. Gómez-Vidales // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2015. – № 133. – P. 32-35.

112. Chen, H. Long non-coding XIST raises methylation of TIMP-3 promoter to regulate collagen degradation in osteoarthritic chondrocytes after tibial plateau fracture [Electronic resource] / H. Chen, S. Yang, R. Shao // *Arthritis Res Ther*. – 2019. – № 21(1):271. Doi: 10.1186/s13075-019-2033-5.

113. Chrysin reduces oxidative stress but does not affect polyol pathway in the lenses of type 1 diabetic rats / W. Wojnar, M. Zych, S. Borymski, I. Kaszmarczyk-Sedlak // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – 160 p.

114. Chumakov, A. A. Nature of Intermediates in Fenton Reaction Systems [Text] / A. A. Chumakov, T. S. Minakova, Yu. G. Slizhov // *Chemistry for Sustainable Development*. – 2017. – Vol. 25, № 5. – P. 565–584.

115. Comparative analysis of the expression of metalloproteases (MMP-2, MMP-9, MMP-11 and MMP-13) and the tissue inhibitor of metalloprotease 3 (TIMP-3) between previous negative biopsies and radical prostatectomies [Electronic resource] / Medina-González A, Eiró-Díaz N, Fernández-Gómez JM [et al.] // *Actas Urol Esp*. – 2019. – Pii: S0210-4806(19)30192-5. Doi: 10.1016/j.acuro.2019.10.004.

116. Comparative expression of matrix metalloproteinases in internal malignancies and paired cutaneous metastatic lesions [Text] / T. H. Kim, J. Y. Jung, H. J. Roh [et al.] // *Am J Dermatopathol*. – 2015. – № 37(5). – P. 381-388.

117. Comparison of the Anti-Inflammatory Activity of Sodium Acexamate and Zinc Acexamate in Healing Skin Wounds in Rabbits [Text] / O. Guillard, P. Masson, A. Piriou [et al.] // *Pharmacology*. – 1987. – Vol. 34, № 5. – P. 296- 300.

118. Comparison of the perioperative time courses of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitor (TIMP-1) during carotid artery stenting (CAS) and carotid endarterectomy (CEA) [Electronic resource] / A. Mérei, B. Nagy, G. Woth [et al.] // *BMC Neurol*. – 2018. – №18:128. Doi: 10.1186/s12883-018- 1133-1

119. Conjunctival matrix metalloproteinases and their inhibitors in

glaucoma patients [Text] / M. Helin-Toiviainen, S. Rönkkö, T. Puustjärvi [et al.] // *Acta Ophthalmol.* – 2015. – № 93(2). – P. 165-71.

120. Dietary supplementation of xylanase and protease on growth performance, digesta viscosity, nutrient digestibility, immune and oxidative stress status, and gut health of newly weaned pigs [Text] / M. E. Duarte, F. X. Zhou, W. M. Jr Dutra, S. W. Kim // *Anim Nutr.* – 2019. – № 5(4). – P. 351-358.

121. Does Arterial Hypertension Affect Plasma Levels of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Patients with Stable Coronary Artery Disease? A Preliminary Study / W. Kuliczowski, M. Banaszkiwicz, A. Mysiak [et al.] // *Cardiol Res Pract.* – 2019. – № 6921315. Doi: 10.1155/2019/6921315.

122. Dynamics of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1 in a rat model of brain injury combined with traumatic heterotopic ossification [Text] / W.-Z. Shi, J.-Y. Ju, H.-J. Xiao [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2017. – Vol. 15, № 4. – P. 2129-2135.

123. EARTH Study Team. Urinary oxidative stress biomarker levels and reproductive outcomes among couples undergoing fertility treatments [Text] / Rosen EM, Mínguez-Alarcón L, Meeker JD [et al.] // *Hum Reprod.* – 2019. – № 34(12). – P. 2399-2409.

124. Effect of Liuweibuqi capsules on the balance between MMP-9 and TIMP1 and viability of alveolar macrophages in COPD [Electronic resource] / C. Wang, H. Ding, X. Tang [et al.] // *Biosci Rep.* – 2017. – № 37(5). – Pii: BSR20170880. Doi: 10.1042/BSR20170880.

125. Effects of Biejia Ruangan Tablet-containing serum on matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cultured renal interstitial fibroblasts [Text] / Zhou J, Chen XM, Liu SW [and etc.] // *Chin J IntegrMed.* – 2015. – № 21(2). – P. 152-6.

126. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions [Text] / O. Erel // *Clinical Biochemistry.* – 2004. – № 37. – P. 112-119.

127. Erel, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status [Text] / O. Erel // *Clinical Biochemistry*. – 2005. – № 38. – P. 1103-1111.
128. Evaluation of matrix metalloproteinase, myeloperoxidase, and oxidative damage in mesenteric ischemia-reperfusion injury [Text] / A. Kocael, B. B. Inal, G. Guntas [et al.] // *Hum Exp Toxicol*. – 2016. – № 35(8). – P. 851-860.
129. Evaluation of Micro-RNA Levels, Apoptosis and Oxidative Stress Markers in Patients Receiving Chemotherapy [Electronic resource] / Kirhan I, Kas F, Taskiran H, [et al.] // *Comb Chem High Throughput Screen*. – 2019. Doi: 10.2174/1386207323666191224111348.
130. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in canine testis, epididymis and semen [Text] / C. Warinrak, J. T. Wu, W. L. Hsu [et al.] // *Reprod Domest Anim*. – 2015. – № 50(1). – P. 48-57.
131. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in rat models of pressure ulcer and their significance [Text] / Yi-Qing Tian, Xiao-Hui Ning, De-Yun Yin [et al.] // *Int J Clin Exp Med*. – 2019. – Vol. 12, № 6. – P. 7209-7216.
132. Friends or foes: matrix metalloproteinases and their multifaceted roles in neurodegenerative diseases [Electronic resource] / M. Brkic, S. Balusu, C. Libert, R. E. Vandenbroucke // *Mediators Inflamm*. – 2015. Doi: 10.1155/2015/620581.
133. Genetic Polymorphism and Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Periapical Lesions: Systematic Review [Electronic resource] / A. F. C. Torres, L. S. Antunes, N. F. Oliveira [et al.] // *J Endod*. – 2020. – № 46(1):3-11.e1. Doi: 10.1016/j.joen.2019.10.011.
134. Glutathione Transferase U13 Functions in Pathogen-Triggered Glucosinolate Metabolism [Text] / Piślewska-Bednarek M., Ryohei T.N., Hiruma K. [et al.] // *Published January*. – 2018. – P. 538-551.
135. Goulay, J. Process for directly obtaining the calcium and magnesium salts of the N-acetyl-amino-6-hexanoic acid from acetyl-caprolactame [Electronic source] / Jean Goulay // *US Patent 3974215*. – 1976.



<https://patents.justia.com/patent/3974215>.

136. Gross, J. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay [Text] / J. Gross, C. Lapiere // Proc. Natl. Acad.Sci. USA. – 1962. – № 48. – P. 1014-1022.

137. Hansen, J. The redox theory of development [Electronic resource] / J. Hansen, D. P. Jones, C. Harris // Antioxid Redox Signal. – 2019. Doi: 10.1089/ars.2019.7976

138. Hazman, Ö. Effects of Oral Anti-diabetic Agent Sitagliptin on Total Antioxidant and Oxidant Status in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus [Text] / Ö. Hazman, S. Çelik // Journal of Applied Biological Sciences. – 2014. – Vol. 8, №1. – P. 31-37.

139. Health Benefit of the Flavonoids from Onion: Constituents and Their Pronounced Antioxidant and Anti-neuroinflammatory Capacities [Electronic resource] / Li Q, Wang Y, Mai Y [et al.]. // J Agric Food Chem. – 2020. Doi: 10.1021/acs.jafc.9b07418

140. <http://gmlocge.by/recommendations/antioksidanty-v-srede-obitaniya>

141. Ighodaro, O. M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid [Electronic resource] / O. M. Ighodaro, O. A. Akinloye // Alexandria Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 54, № 4. – P. 1-7.

142. Imbalance of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors is Correlated with Trabeculectomy Outcomes in Acute Primary Angle Closure [Electronic resource] / Qian T, Fu M, Hu C [et al.] // Am J Ophthalmol. – 2019. – Pii: S0002-9394(19)30615-4. Doi: 10.1016/j.ajo.2019.12.014.

143. Impact of MMP-2 and MMP-9 enzyme activity on wound healing, tumor growth and RACPP cleavage [Electronic resource] / D.V. Hingorani, C.N. Lippert, J.L. Crisp [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, № 9. – e0198464. Doi: 10.1371/journal.pone.0198464.

144. Induced Pluripotent Stem Cells Attenuate Endothelial Leakage in Acute Lung Injury via Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 to Reduce Focal

Adhesion Kinase Activity [Text] / V. Y. Su, S. H. Chiou, C. S. Lin [and etc.] // *Stem Cells*. – 2019. – № 37(12). – P. 1516-1527.

145. Interrelationship between oxidative stress, DNA damage and cancer risk in diabetes (Type 2) in Riyadh, KSA [Text] / M. Abudawood, H. Tabassum, B. Almaarik, A. Aljohi // *Saudi J Biol Sci*. – 2020. – № 27(1). – P. 177-183.

146. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level [Text] / A. Z. Sadeghabadi, R. Abbasalipourkabir, R. Mohseni, N. Ziamajidi // *J Diabetes Metab Disord*. – 2019. – № 18 (2). – P. 437-443.

147. Jaoude, J. Matrix metalloproteinases in exercise and obesity [Text] / J. Jaoude, Y. Koh // *Vasc Health Risk Manag*. – 2016. – № 12. – P. 287-295.

148. Khorsand, M. Efficacy of melatonin in restoring the antioxidant status in the lens of diabetic rats induced by streptozotocin [Text] / M. Khorsand, M. Akmal, M. Akhzari // *J Diabetes Metab Disord*. – 2019. – № 18(2). – P. 543-549.

149. Król, M. Human Nitric Oxide Synthase – Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases [Electronic resource] / M. Król, M. Kepinska // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, № 1. – 56. Doi: 10.3390/ijms22010056.

150. Kuhad, A. Matrix metalloproteinases: potential therapeutic target for diabetic neuropathic pain [Text] / A. Kuhad, P. Singh, K. Chopra // *Expert Opin Ther Targets*. – 2015. – № 19(2). – P. 177-85.

151. Lau M, Giri K, Garcia-Bennett AE. Antioxidant properties of probucol released from mesoporous silica. [Electronic resource] / M. Lau, K. Giri, A. E. Garcia-Bennett // *Eur J Pharm Sci*. – 2019. – Vol. 138. – 105038.

152. Levels of Selected Matrix Metalloproteinases, Their Inhibitors in Saliva, and Oral Status in Juvenile Idiopathic Arthritis Patients vs. Healthy Controls [Electronic resource] / A. Kobus, J. Bagińska, J. Łapińska-Antończuk [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2019. – № 7420345. Doi: 10.1155/2019/7420345.

153. Liuweibuqi capsules improve pulmonary function in stable chronic obstructive pulmonary disease with lung-qi deficiency syndrome by regulating

STAT4/STAT6 and MMP-9/TIMP-1 [Text] / D. D. Shen, Z. H. Yang, J. Huang [and etc.] // *Pharm Biol.* – 2019. – № 57(1). – P. 744-752.

154. Matrisome-Associated Gene Expression Patterns Correlating with TIMP2 in Cancer [Electronic resource] / Peeney D, Fan Y, Nguyen T [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – № 9(1):20142. Doi: 10.1038/s41598-019-56632-3.

155. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration [Text] / R. Mohan, S.K. Chintala, J.C. Jung [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, №3. – P. 2065-2072.

156. Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuates liver inflammation and fibrosis in cirrhotic rats [Electronic resource] / S. Turkseven, M. Bolognesi, A. Brocca [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2019. Doi: 10.1152/ajpgi.00135.2019.

157. MMP-12 and TIMP Behavior in Symptomatic and Asymptomatic Critical Carotid Artery Stenosis [Text] / F. Del Porto, N. Cifani, M. Proietta [et al.] // *J Stroke Cerebrovasc Dis.* – 2017. – № 26(2). – P. 334-338.

158. MMP-2 and MMP-9 plasma levels are potential biomarkers for indeterminate and cardiac clinical forms progression in chronic Chagas disease [Electronic resource] / N. I. Medeiros, J. A. S. Gomes, J. A. Fiuza [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – № 9(1):14170. Doi: 10.1038/s41598-019-50791-z.

159. MMP-2 salivary activity in type 2 diabetes mellitus patients [Electronic resource] / J. A. Arreguin-Cano, B. Ayerdi-Nájera, A. Tacuba-Saavedra [et al.] // *Diabetol Metab Syndr.* – 2019. – №11:113. Doi: 10.1186/s13098-019-0510-2. eCollection 2019.

160. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo [Text] / J. Gaffney, I. Solomonov, E. Zehorai, I. Sagi // *Matrix Biol.* – 2015. – № 44-46. – P. 191-199.

161. Multivalent Pseudopeptides Targeting Cell Surface Nucleoproteins Inhibit Cancer Cell Invasion through Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 (TIMP-3) Release [Text] / D. Destouches, E. Huet, M. Sader [et al.] // *J Biol Chem.* – 2012. – № 287(52). – P. 43685-43693.

162. Navratilova, Z. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Text] / Navratilova Z, Kolek V, Petrek M. // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). – 2016. – № 64(3). – P. 177-193.
163. Neonicotinoid insecticides exposure cause amino acid metabolism disorders, lipid accumulation and oxidative stress in ICR mice [Electronic resource] / Yan S, Meng Z, Tian S [et al.]. // Chemosphere. – 2019. – № 246:125661. Doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125661
164. Neuroglobin: A Novel Player in the Oxidative Stress Response of Cancer Cells [Electronic resource] / Montalesi E., Marino M., Fiocchetti M., Fernandez V.S. // Oxid Med Cell Longev. – 2019. Doi: 10.1155/2019/6315034.
165. Nitric Oxide: From Gastric Motility to Gastric Dysmotility [Electronic resource] / E. Idrizaj, C. Traini, M.G. Vannucchi, M.C. Baccari // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol.22, №18. Doi: 10.3390/ijms22189990.
166. Nootropic effects of synthetic flavonoid derivatives on scopolamine induced memory impairment in mice via cholinesterase inhibition and antioxidant system [Text] / M. Ghias, M. Shoaib, S. W. Ali Shah [et al.] // Pak J Pharm Sci. – 2019. – № 32(5). – P. 2325-2332.
167. Overexpression of TIMP-1 under the MMP-9 promoter interferes with wound healing in transgenic mice [Text] / T. Salonurmi, M. Parikka, S. Kontusaari [et al.] // Cell and Tissue Research. – 2004. – Vol. 315. – P. 27-37.
168. Oxidative stress and cancer development: Are non-coding RNAs the missing links? [Electronic resource] / L. C. D'Souza, S. Mishra, A. Chakraborty [et al.] // Antioxid Redox Signal. – 2019. Doi: 10.1089/ars.2019.7987.
169. Parkin and Nrf2 prevent oxidative stress-induced apoptosis in intervertebral endplate chondrocytes via inducing mitophagy and anti-oxidant defenses [Electronic resource] / L. Kang, S. Liu, J. Li [et al.] // Life Sci. – 2019. – № 117244. Doi: 10.1016/j.lfs.2019.117244.
170. Persistence of cirrhosis is maintained by intrahepatic regulatory T cells that inhibit fibrosis resolution by regulating the balance of tissue inhibitors of metalloproteinases and matrix metalloproteinases [Text] / Zhang X, Feng M, Liu X

[and etc.] // *Transl Res.* – 2016. – № 169. – P. 67-79.

171. Pinyaev SI, Kuzmenko TP, Revina NV [et al.] Influence of Resveratrol on Oxidation Processes and Lipid Phase Characteristics in Damaged Somatic Nerves [Electronic resource] // *Biomed Res Int.* – 2019. – № 2381907. Doi: 10.1155/2019/2381907.

172. Plasma Levels and Tissue Expression of Selected Cytokines, Metalloproteinases and Tissue Inhibitors in Patients With Cervical Cancer [Text] / Sidorkiewicz I, Piskór B, Dąbrowska E [et al.] // *Anticancer Res.* – 2019. – № 39(11). – P. 6403-6412.

173. Platelet-derived growth factor-D modulates extracellular matrix homeostasis and remodeling through TIMP-1 induction and attenuation of MMP-2 and MMP-9 gelatinase activities [Text] / E. Borkham-Kamphorst, P. Alexi, L. Tihaa [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – № 457(3). – P. 307- 313.

174. Products of Sulfide/Selenite Interaction Possess Antioxidant Properties, Scavenge Superoxide-Derived Radicals, React with DNA, and Modulate Blood Pressure and Tension of Isolated Thoracic Aorta [Electronic resource] / M. Grman, A. Misak, L. Kurakova [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – № 9847650. Doi: 10.1155/2019/9847650.

175. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [Text] / Liang Gong, Dan Wu, Jianding Zou [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – № 7(14). – P. 18458–18468.

176. Qian, Z.M. Rapid screening and characterization of natural antioxidants in *Polygonum viviparum* by an on-line system integrating the pressurised liquid micro-extraction, HPLC-DAD-QTOF-MS/MS analysis and antioxidant assay [Electronic resource] / Z. M. Qian, L. Chen, M. Q. Wu, D. Q. Li // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2019. – № 1137:121926. Doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121926.

177. Ramos-Martínez AG, Enciso-Moreno JA, Espinosa-Ayala I [et al.] Expression kinetics of metalloproteinases and their tissue inhibitors in experimental murine pulmonary tuberculosis [Electronic resource] // *Exp Lung Res.* – 2015. – №

41(1):1-11. Doi: 10.3109/01902148.2014.956946. Epub 2014 Oct 2.

178. Recombinant Klotho Protects Human Periodontal Ligament Stem Cells by Regulating Mitochondrial Function and the Antioxidant System during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress [Electronic resource] / H. Chen, X. Huang, C. Fu [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – № 9261565. Doi: 10.1155/2019/9261565.

179. Reichenbach, J. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. [Text] / J Reichenbach // *Antioxidants & redox signaling.* – 2002. – 4(3). – P.465-469.

180. Release of phenolic compounds and antioxidant capacity of Chinese hawthorn “*Crataegus pinnatifida*” during in vitro digestion [Text] / G. Zheng, J. Deng, L. Wen, L. You. // *Journal of Functional Foods.* – 2018. – V. 40. – P. 76-85.

181. Resuscitation with Drag Reducing Polymers after Traumatic Brain Injury with Hemorrhagic Shock Reduces Microthrombosis and Oxidative Stress [Text] / D. E. Bragin, O. A. Bragina, M. V. Kameneva, E. M. Nemoto // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – № 1232. – P. 39-45.

182. Resveratrol attenuates the blood-brain barrier dysfunction by regulation of the MMP-9/TIMP-1 balance after cerebral ischemia reperfusion in rats [Text] / H. Wei, S. Wang, L. Zhen [et al.] // *J Mol Neurosci.* – 2015. – № 55(4). – P. 872-879.

183. Rezaie, F. Regeneration and Repair of Skin Wounds: Various Strategies for Treatment [Text] / F. Rezaie, M. Momeni-Moghaddam, H. Naderi-Meshkin // *Int J of Lower Extremity Wounds.* – 2019. – Vol. 18, № 3. – P. 247- 261.

184. Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension [Text] / Robaczewska J., Kedziora-Kornatowska K., Kozakiewicz M., [et al.] // *Journal of physiology and pharmacology.* – 2016. – Vol. 67. – №3. P. 331-337.

185. Safety and efficacy of epsilon aminocaproic acid (EACA) as an antihemorrhagic drug in bilateral one stage total knee arthroplasty: A double-blind randomized controlled trial [Electronic resource] / S. K. Tripathy, P. B. Rao, S. N. Nanda [et al.] // *Knee.* – 2019. – Pii: S0968-0160(18)30797-X. Doi:

10.1016/j.knee.2019.09.019.

186. Satish B.N. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms [Text] / B. N. Satish, P. Dilipkumar // RSC Advances. – 2015. – Vol. 5(35). – P. 27986–28006.

187. Scarlata, E. Antioxidant enzymes and male fertility: lessons from knockout models [Electronic resource] / E. Scarlata, C. O'Flaherty // Antioxid Redox Signal. – 2019. Doi: 10.1089/ars.2019.7985.

188. Schelbert, H. R. Recombinant Tissue Inhibitor Subdues Matrix Metalloproteinases and Produces Novel Images With New Possibilities [Electronic resource] / H. R. Schelbert // Circ Cardiovasc Imaging. – 2019. – № 12(11). Doi: 10.1161/Circimaging.119.009915.

189. Schieber M., Chandel N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress [Text] / Schieber M., Chandel N. S. // Current Biology. – 2014. – № 24(10). – P. 453-462.

190. Schimke, I. Decreased oxidative stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy one year after immunoglobulin adsorption [Text] / I. Schimke // Journal of the American College of Cardiology. – 2001. – № 1. – P.178-83.

191. Selenium exerts protective effects against oxidative stress and cell damage in human thyrocytes and fibroblasts [Electronic resource] / Ruggeri RM, D'Ascola A, Vicchio TM [et al.] // Endocrine. – 2019. Doi: 10.1007/s12020- 019-02171-w.

192. Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in autoimmune encephalitis [Electronic resource] / R. Matsuura, S. I. Hamano, A. Daida [et al.] // Brain Dev. – 2019. – Pii: S0387-7604(19)30531-5. Doi: 10.1016/j.braindev.2019.11.010.

193. Sies, H. Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. [Text] / H, Sies // Redox Biol. – 2017. – Vol. 11. – P. 613-619.

194. Simvastatin pretreatment ameliorates t-PA-induced hemorrhage

transformation and MMP-9/TIMP-1 imbalance in thromboembolic cerebral ischemic rats [Text] / Yin B, Li DD, Xu SY, Huang H [et al.] // *Neuropsychiatr Dis Treat.* – 2019. – № 15. – P. 1993-2002.

195. Skin tissue regeneration for burn injury [Electronic resource] / A. Shpichka, D. Butnaru, E.A. Bezrukov [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy.* – 2019. – Vol. 10. – Art. 94. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1203-3>.

196. Staphylococcus aureus on the effect of expression of MMPs/TIMPs and uPA system in bovine mammary fibroblasts [Electronic resource] / Miao Z, Ding Y, Bi Y [et al.] // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2019. – Pii: S1684- 1182(19)30160-4. Doi: 10.1016/j.jmii.2019.09.008.

197. Superoxide imbalance triggered by Val16Ala-SOD2 polymorphism increases the risk of depression and self-reported psychological stress in free-living elderly people [Electronic resource] / I. E. da Cruz Jung, I. B. M. da Cruz, F. Barbisan [et al.] // *Mol Genet Genomic Med.* – 2019. – № e1080. Doi: 10.1002/mgg3.1080.

198. Suppresses matrix metalloproteinases and myocardial apoptosis in rats with myocardial infarction and depression [Electronic resource] / Hu Y, Dong X, Zhang T [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2019. Doi: 10.3892/mmr.2019.10807.

199. Systemic matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in severe sepsis-associated coagulopathy [Text] / M. Sivula, J. Hästbacka, A. Kuitunen [et al.] // *Acta Anaesthesiol Scand.* – 2015. – № 59(2). – P. 176-84.

200. Tachtsidis I. Broadband NIRS Cerebral Evaluation of the Hemodynamic and Oxidative State of Cytochrome-c-Oxidase Responses to +Gz Acceleration in Healthy Volunteers [Text] / F. Lange, G. Bale, P. Kaynezhad [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – № 1232. – P. 339-345.

201. The Diverse Roles of TIMP-3: Insights into Degenerative Diseases of the Senescent Retina and Brain [Electronic resource] / J. M. Dewing, R. O. Carare,

A. J. Lotery, J. A. Ratnayaka // *Cells.* – 2019. – № 9(1). Doi: 10.3390/cells9010039.



202. The effect of zinc acexamate on oxidative stress, inflammation and mitochondria induced apoptosis in rat model of renal warm ischemia [Text] / Hadj Abdallah N., Baulies A., Bouhlel A. [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 105. – P. 573-581.

203. The labile iron pool attenuates peroxynitrite-dependent damage and can no longer be considered solely a pro-oxidative cellular iron source [Text] / F.

C. Damasceno, A. L. Condeles, A. K. P. Lopes [et al.] // *J Biol Chem.* – 2018. – № 293(22). – P. 8530-8542.

204. The Potential Role of Matrix Metalloproteinases 8 and 9 and Myeloperoxidase in Predicting Outcomes of Bacterial Meningitis of Childhood [Electronic resource] / Savonius O, Roine I, Alassiri S [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2019. – № 7436932. Doi: 10.1155/2019/7436932.

205. The role of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor TIMP-1 in burn injury: a systematic review [Text] / C. Sharma, G.P. Dobson, L.M. Davenport [et al.] // *Int J Burns Trauma.* – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 275-288.

206. The role of matrix metalloproteinase-9 as a prognostic biomarker in papillary thyroid cancer [Electronic resource] / Maryam Zarkesh, Azita Zadeh-Vakili, Mahdi Akbarzadeh [et al.] // *BMC Cancer.* – 2018. – №18:1199. Doi: 10.1186/s12885-018-5112-0.

207. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases [Electronic resource] / Cabral-Pacheco G.A, Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C. [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 24. – 9739 p. Doi: 10.3390/ijms21249739.

208. The roles of MMP-9/TIMP-1 in cerebral edema following experimental acute cerebral infarction in rats [Text] / D.-D. Li, J.-N. Song, H. Huang, X.-Y. Guo // *Neuroscience Letters.* – 2013. – Vol. 550. – P. 168-172.

209. TIMP-1 Attenuates the Development of Inflammatory Pain Through MMP-Dependent and Receptor-Mediated Cell Signaling Mechanisms [Electronic resource] / B. E. Knight, N. Kozlowski, J. Havelin [et al.] // *Front Mol Neuro-sci.* – 2019. – № 12:220. Doi: 10.3389/fnmol.2019.00220.

210. TIMP-1 is Overexpressed and Secreted by Platinum Resistant Epithelial Ovarian Cancer Cells [Electronic resource] / M. Sonogo, E. Poletto, E. Pivetta [et al.] // *Cells*. – 2019. – № 9(1). – Pii: E6. Doi: 10.3390/cells9010006.

211. TIMP-2 polymorphisms define subtypes of hypertensive intracerebral hemorrhage with distinct perihematomal edema development patterns [Electronic resource] / R. Chen, Z. Song, W. Zheng [et al.] // *Curr Neurovasc Res*. – 2019. Doi: 10.2174/1567202617666191223145632.

212. TIMP-2 suppresses tumor growth and metastasis in murine model of triple-negative breast cancer [Electronic resource] / Peeney D, Jensen SM, Castro NP [et al.] // *Carcinogenesis*. - 2019. - pii: bgz172. Doi: 10.1093/carcin/bgz172.

213. TIMPs : versatile extracellular regulators in cancer [Text] / H. W. Jackson, V. Defamie, P. Waterhouse, R. Khokha // *Nat Rev Cancer*. – 2017. – № 17(1). – P. 38-53.

214. Tissue inhibitor of metalloproteinase proteins inhibit teratoma growth in mice transplanted with pluripotent stem cells [Electronic resource] / K. A. Choi, H. K. Park, I. Hwang [et al.] // *Stem Cells*. – 2019. Doi: 10.1002/stem.3132.

215. Toczewska, J. Activity of enzymatic antioxidants in periodontitis: A systematic overview of the literature [Text] / J. Toczewska, T. Konopka // *Dent Med Probl*. – 2019. – № 56(4). – P. 419-426.

216. Total antioxidant and oxidant status of plasma and renal tissue of cis-platin-induced nephrotoxic rats: protection by floral extracts of *Calendula officinalis* Linn [Text] / P.K. Verma, R. Raina, M. Sultana [et al.] // *Ren Fail*. – 2016. – Vol. 38, № 1. – P. 142-150.

217. Tumor progression driven by pathways activating matrix metalloproteinases and their inhibitors [Text] / M. Bodnar, L. Szyllberg, W. Kazmierczak, A. Marszalek // *J Oral Pathol Med*. - 2015. - № 44(6). - P. 437-443.

218. Two classes of matrix metalloproteinases reciprocally regulate synaptogenesis [Text] / M. L. Dear, N. Dani, W. Parkinson [et al.] // *Development*. – 2016. – № 143(1). – P. 75-87.

219. Urinary Emmprin, matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of

metalloproteinase 1 as potential biomarkers in children with ureteropelvic junction narrowing on conservative treatment [Text] / F. Tian, C. Gu, Z. Zhao [et al.] // Nephrology (Carlton). – 2015. – № 20(3). – P. 194-200.

220. Urinary tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and insulin-like growth factor-binding protein 7 as biomarkers of patients with established acute kidney injury [Electronic resource] / W. Y. Cho, S. Y. Lim, J. H. Yang [et al.] // Korean J Intern Med. – 2019. Doi: 10.3904/kjim.2018.266.

221. Wound Fluid Matrix Metalloproteinase-9 as a Potential Predictive Marker for the Poor Healing Outcome in Diabetic Foot Ulcers [Electronic resource]

/ P. Jindatanmanusan, S. Luanraksa, T. Boonsiri [et al.] // Pathology Research International. – 2018. – Art. 1631325. – 5 p.

222. Yang, Z. Extracellular MMP-2 levels are regulated by the low-density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin [Text] / Z. Yang, D.K. Strickland, P. Bornstein // J. Biol. Chem. – 2020. – № 276. – P. 8403-8408.